

**Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Evaluation von Nukleotidpolymorphismen für die
Analyse des hämatopoetischen Spenderchimärismus auf Ebene der cDNA**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Kerstin Schneiker
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2011

Tag der Promotion: 13. Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation	1
1.2 Transplantat-gegen-Leukämie Effekt.....	2
1.3 Transplantat-gegen-Wirt Reaktion.....	4
1.4 T-Zell-Depletion.....	7
1.5 Prophylaktische Gabe CD8-depletierter Spenderlymphozyten.....	8
1.6 Stellenwert Antigenpräsentierender Zellen für die GvHD.....	9
1.7 Die Bedeutung der Langerhans Zelle.....	12
1.8 Hämatopoetischer Chimärismus	13
1.8.1 Methoden der Chimärismusbestimmung.....	15
1.9 Single Nucleotide Polymorphisms	16
2 Zielsetzung der Arbeit.....	18
3 Material.....	19
3.1 Puffer und Lösungen	19
3.2 Chemikalien und Reagenzien.....	20
3.3 Geräte	21
3.4 Glas- und Plastikwaren.....	23
3.5 Antibiotika.....	25
3.6 Molekularbiologische Materialien	25
3.6.1 Enzyme.....	25
3.6.2 Längenstandards.....	25
3.7 Immunomagnetische und FACS-vermittelte Zellseparation.....	26
3.7.1 Antikörper (FACS).....	26
3.7.2 Antikörper (Zytospin).....	26
3.8 Kits	26
3.9 Software und Internetseiten.....	27
4 Methoden	28
4.1 Gewinnung von Langerhans Zellen	28

4.1.1 Isolierung der Langerhans Zellen.....	28
4.1.2 Einzelzellsuspension	29
4.2 Durchflusszytometrie	30
4.3 Immunfluoreszenzfärbung von Langerhans Zellen.....	31
4.4 Immunomagnetische Separation	33
4.5 Ficoll-Dichtezentrifugation	33
4.5.1 Fraktionierung	34
4.6 RNA-Isolierung	34
4.7 Synthese der cDNA	35
4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
4.8.1 Gelelektrophorese.....	37
4.8.2 Multiplex-PCR	37
4.8.3 Aufreinigung des Multiplex-PCR-Produktes	38
4.9 Mini-Sequenzierung.....	39
4.10 Sequenzierung	42
4.10.1 Kettenabbruch-Methode nach Sanger	42
4.10.2 Cycle-Sequenzierung.....	43
4.10.3 Kapillargelelektrophorese	44
4.10.4 Durchführung der Sequenzierung	44
4.10.4.1 Probenvorbereitung.....	44
4.10.4.2 Sequenzierung.....	45
4.11 Short Tandem Repeats – STR	46
5 Ergebnisse.....	48
5.1 Charakterisierung geeigneter SNPs.....	48
5.2 Ausschluss von Kontaminationen genomischer DNA	49
5.3 Primer- und Sondendesign	50
5.4 Expressivität der ausgewählten Gene.....	51
5.5 Multiplex-PCR.....	54
5.6 Mini-Sequenzierung.....	56
5.7 Unterscheidung HLA-identischer Geschwister.....	60
5.8 Minor-Histokompatibilitätsantigene	67

6 Diskussion	69
6.1 Methoden der Chimärismusbestimmung	69
6.1.1 Möglichkeiten der SNP-Analyse.....	71
6.1.2 STR versus SNP	72
6.1.3 Vorteile der cDNA-basierten Chimärismusanalyse	74
6.2 Optimierung der Methoden	75
6.2.1 Quantifizierung.....	76
6.3 Evaluation der SNPs.....	77
6.4 Minor-Mismatch	78
6.5 Chimärismus von Subpopulationen	79
6.6 Applikation von Spenderlymphozyten.....	80
6.7 Bedeutung der Langerhans Zellen für die GvHD	81
7 Zusammenfassung	84
8 Literaturverzeichnis	86
9 Anhang.....	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle(n)
BD	BigDye
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CC	complete chimerism (kompletter Chimärismus)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CMV	Zytomegalovirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DLI	donor lymphocyte infusions (Spenderlymphozyten Applikation)
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DZ	Dendritische Zelle(n)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GvHD	Graft versus host disease (Transplantat-gegen-Wirt Reaktion)
GvL	Graft versus leukemia (Transplantat-gegen-Leukämie)
GvM	Graft versus Malignancy (Transplantat-gegen-Malignität)
HA-1	Histokompatibilitätsantigen 1
HLA	Humane Leukozytenantigene

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	human serum albumin (Humanes Serumalbumin)
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
K562	myeloische Blutzellen einer Leukämie-Zelllinie
KZ	Keratinozyt(en)
LZ	Langerhans Zelle(n)
mHAg(s)	Minor-Histokompatibilitätsantigen(e)
MACS	Magnetic Cell Separation (magnetische Zellseparation)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
MC	mixed chimerism (gemischter Chimärismus)
MHC	major histocompatibility complex (Major Histokompatibilitätskomplex)
MRD	minimal residual disease (minimale Resterkrankung)
NK	Natürliche Killerzelle(n)
PBMC	peripheral blood monocytes (Periphere Blutmonozyten)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythin
RFLP	Restriktions-Fragment Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP	Single Nucleotid Polymorphism(s) (Einzelne Nukleotidpolymorphismen)
STR	short tandem repeats (kurze sich wiederholende Sequenzen)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline

TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
upm	Umdrehungen pro Minute
VNTR	Variable number of tandem repeats (variable Anzahl sich wiederholender Sequenzen)
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) ist es das Ziel, die Hämatopoese eines Patienten durch ein gesundes blutbildendes System dauerhaft zu ersetzen. Zunächst wird der Patient mit einer Konditionierung, welche aus einer Chemotherapie und/oder einer Bestrahlung besteht, behandelt. Dieses Verfahren führt zu einer Reduktion der Zellen der Blutbildung und agiert gegen die maligne Grundkrankheit des Patienten. Sie ist Voraussetzung für ein Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen (engl.: Engraftment), die nach erfolgtem Konditionierungsregime transplantiert werden, und welche die Produktion neuer hämatopoetischer Zellen ermöglicht.

Handelt es sich dabei um Stammzellen, die dem Patienten selbst vor Beginn der Therapie entnommen wurden, so spricht man von einer autologen Transplantation. Hingegen stammen die Zellen bei einer allogenen Transplantation von einem Patienten unterschiedlichen Spender. Bei Transplantation von einem eineiigen Zwilling, der genetisch identisch zum Patienten ist, spricht man von syngener Transplantation. Die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen kann u.a. durch eine Aspiration aus dem Beckenkamm des Spenders erfolgen. Inzwischen hat sich jedoch die Methode der Mobilisation der Zellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren durchgesetzt, wobei die Blutstammzellen nach Stimulation in das periphere Blut auswandern und von dort mittels Leukapherese gesammelt werden (Lane et al. 1995).

Eine weitere Quelle zur Gewinnung von Stammzellen ist das Nabelschnurblut, dessen Einsatz beim Erwachsenen jedoch unter anderem durch eine geringe Anzahl der isolierten Stammzellen nur begrenzt möglich ist (Gluckman & Rocha 2004; Tse & Laughlin 2005).

Seit der ersten Knochenmarkstransplantation 1956 von E.D. Thomas - als Therapie maligner hämatologischer Krankheiten durchgeführt - etablierte sich diese Methode im Verlauf der Jahre und stellt auch heute noch häufig die einzig kurative Therapieoption für die Behandlung vieler hämatologischer Erkrankungen dar (Tabbara et al. 2003; Thomas et al. 1957).

Hauptsächlich eingesetzt wird die HSZT zur Behandlung von akuten Leukämien mit hohem Rezidivrisiko, bei lymphatischen Neoplasien, aplastischen Anämien und dem Myelodysplastischen Syndrom.

Dank der stetigen Weiterentwicklung von supportiven Maßnahmen der immunsuppressiven und antibiotischen Medikamente und insbesondere durch das Verständnis des HLA-Systems (Humane Leukozytenantigene) zur Identifizierung geeigneter allogener Knochenmarkspender sowie der Verbesserung des Verständnisses der involvierten immunologischen Mechanismen, hat sich die Stammzelltherapie fortlaufend verbessert. Während die klassische hochdosierte Konditionierung die Hämatopoese des Patienten vollständig eliminierte, sind neuere nicht-myeloablative Konditionierungsverfahren weniger aggressiv und erlauben damit auch Behandlungen bei älteren und stärker vorbehandelten Patienten (Carella et al. 2000; Sorror et al. 2004). Eine solche nicht-myeloablative Konditionierung führt in erster Linie zu einer Suppression des Immunsystems des Empfängers (engl.: Host) und ermöglicht das Engraftment der Stammzellen des Spenders (engl.: Donor) im Knochenmark. Der antimaligne Effekt der Hochdosistherapie tritt dabei in den Hintergrund. Die wesentliche therapeutische Wirkung dieser Transplantation wird durch den Transplantat-gegen-Leukämie Effekt vermittelt (Giralt et al. 1997; McSweeney et al. 2001; McSweeney & Storb 1999; Slavin et al. 1998; Sykes et al. 1999).

1.2 Transplantat-gegen-Leukämie Effekt

Der Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (engl.: Graft versus Leukemia; GvL) beschreibt eine Immunreaktion der Spenderlymphozyten gegen maligne Zellen des Empfängers nach erfolgter Stammzelltransplantation. Diese Immunreaktion wurde erstmals von Barnes und Loutit Mitte der 50er beschrieben, die anhand von Mäusen zeigten, dass nach Transplantation von Blutstammzellen eines vom Empfängerstamm unterschiedlichen Mausstamms Leukämiezellen zerstört wurden. Dies geschah unabhängig von der zuvor durchgeführten Radio- bzw. Chemotherapie. Analoge Versuche mit syngenen Transplantaten (gleicher Mausstamm) verliefen hingegen erfolglos. Des Weiteren beobachteten sie an den Mäusen nach Transplantation mit

Stammzellen eines nicht-identischen Mausstamms Hautabnormalitäten und Diarrhö. Um sie von den Strahlenschäden abzugrenzen, nannten sie diese „secondary disease“, welche der Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (engl.: Graft versus Host Disease; GvHD) entspricht (s. 1.3). Auffällig war, dass Mäuse mit diesen Symptomen weniger Rezidive zeigten, als ihre Artgenossen ohne Beschwerden (Barnes & Loutit 1957).

In der Folge wurde gezeigt, dass dieser GvL-Effekt (auch als GvM - Graft versus Malignancy Effekt bezeichnet) eine Immunreaktion insbesondere der Spender T-Lymphozyten des genetisch ungleichen Spenders darstellt. Die GvL wurde kurze Zeit darauf auch erstmals im Menschen beschrieben (Mathe et al. 1965; Weiden et al. 1979; Weiden et al. 1981).

Diese Beobachtungen fanden durch weitere Studien Unterstützung und ergaben nachfolgende Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines Transplantat-gegen-Leukämie Effektes. Zum Einen hatten Patienten ein erhöhtes Rezidivrisiko, wenn sie ein Transplantat erhielten, in dem die T-Zellen zuvor entfernt, sprich depletiert wurden (Horowitz et al. 1990; Maraninchi et al. 1987). Zum Anderen konnte allein durch die Applikation von Spenderlymphozyten (engl.: Donor lymphocyte infusions; DLI) (s. 1.4), die nach Transplantation Patienten mit einem erneut aufgetretenem Rezidiv infundiert wurden, eine komplette Remission induziert werden (Collins et al. 1997; Kolb et al. 1990; Kolb et al. 1995; Kolb et al. 2004).

Ein weiterer Hinweis eines Antitumor-Effektes durch allogene Spenderzellen rührt aus der Beobachtung, dass das Rezidiv-Risiko bei transplantierten Patienten mit GvHD im Vergleich zu Patienten ohne Symptome vermindert ist (Baron et al. 2005; Sullivan et al. 1989; Weiden et al. 1979; Weiden et al. 1981).

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines GvL-Effektes und einer GvHD wurde aufgrund dessen lange vermutet und diskutiert, wohingegen andere Studien berichten, dass eine GvL auch unabhängig von einer Graft-versus-Host Reaktion ablaufen kann (Glass et al. 1992; Mapara & Sykes 2005; Slavin et al. 1990; Sykes et al. 1988). Ebenfalls eine Rolle spielen alloreaktive T-Zellen von HLA-identischen Spendern, die Antigene erkennen, welche durch Aminosäure-Polymorphismen von zellulären Proteinen kodiert werden. Diese Antigene nennt man Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAg). (Goulmy et al. 1996). Werden diese Peptide über das HLA-Antigen präsentiert, können T-Zellen diese Veränderung als

fremd registrieren. Je nach gewebespezifischer Expression der mHAGs entsteht ein Malignom-spezifischer GvL-Effekt oder eine Immunreaktion gegen gesundes Gewebe im Sinne einer GvHD (Falkenburg et al. 2003; Simpson et al. 2001).

1.3 Transplantat-gegen-Wirt Reaktion

Unter einer Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (GvHD) versteht man eine immunologische Reaktion, bei der immunkompetente T-Zellen des Spenders sich nach einer Transplantation gegen Antigenstrukturen des immungeschwächten Empfängers richten und diese zerstören (Ferrara & Deeg 1991; Thomas et al. 1975a; Thomas et al. 1975b). Tritt diese Reaktion innerhalb der ersten 100 Tage auf, so spricht man von einer akuten GvHD (aGvHD), bei einem späteren Aufkommen handelt es sich dagegen um eine chronische GvHD (cGvHD). Neuere Einteilungen der GvHD unterscheiden akute von chronischer GvHD anhand der klinischen und pathologischen Merkmale und nicht mehr streng ausschließlich nach dem Zeitpunkt des Auftretens (Valks et al. 2001).

Von Barnes und Loutit 1956 erstmals als secondary disease beschrieben (Barnes et al. 1956), definierte Billingham 1966 grundlegende immunologische Voraussetzungen für das Auftreten einer GvHD. Er beschrieb zum Einen eine ausreichende Anzahl immunkompetenter Zellen im Spendermaterial, sowie eine Expression von Antigenen des Empfängers, welche die Spenderzellen als fremd erkennen und zum Anderen ein geschwächtes Immunsystem des Empfängers, welches nicht im Stande ist, gegen die transplantierten Zellen anzugehen (Billingham 1966). Diese Gegebenheiten sind einerseits nach allogener Stammzelltransplantation vorhanden, können aber auch bei schweren kombinierten Immundefekten oder bei Frühgeborenen vorkommen, die - wenn auch nur sehr selten - somit auch unter einer Transplantat-gegen-Wirt Reaktion leiden können. Mittlerweile erfasst man die GvHD als ein komplexes Zusammenspiel von der durch die Konditionierung induzierte inflammatorische Reaktion (Ferrara & Deeg 1991), der Aktivierung alloreaktiver Spenderzellen und dem Einfluss ausgeschwemmter Zytokine (Ferrara et al. 2009; Holler et al. 1997) (s.a. 1.6).

Die akute GvHD kann sich klinisch in allen Geweben mit lymphoiden Zellen und in Epithelien manifestieren. Hauptsächlich betroffen sind jedoch die Leber, der

Gastrointestinaltrakt und am häufigsten die Haut bzw. die Schleimhäute. Während die akute GvHD meist die Ursache in der Proliferation und Expansion alloreaktiver Zellen des Spenders hat, handelt es sich bei der chronischen GvHD um eine Multisystemerkrankung mit autoimmunologischer Manifestation (Mapara 2003).



Kutane Manifestationen der aGvHD zeigen sich meist in makulopapulösen Exanthenen (s. Abb. 1.1), besonders an Handflächen und Fußsohlen, sowie im Gesicht.

Abb. 1.1 makulopapulöses Exanthem am Arm bei akuter GvHD. (<http://emedicine.medscape.com/article/429037-overview#a0104>)

Diese können sich jedoch auch auf dem gesamten Körper ausbreiten und sich im schlimmsten Fall zu einer bullösen GvHD mit toxischer Epidermolyse entwickeln.

Neben den mit 90% am häufigsten auftretenden Symptomen an der Haut führt ein Befall des Gastrointestinaltraktes meist zu Übelkeit, Diarrhöen bis



Abb. 1.2 Epidermolyse bei akuter GvHD an den Händen. (<http://emedicine.medscape.com/article/429037-clinical#a0217>)

hin zu Darmblutungen und der Gefahr eines Ileus. Bei einem Leberbefall sind erhöhte Leberparameter mit einer mäßigen Hepatomegalie zu finden.

Erste Bemühungen den klinischen Schweregrad einer akuten GvHD zu definieren, wurden von Glucksberg 1974 unternommen (Glucksberg et al. 1974), im Verlauf mehrere Male verifiziert, bis die zur Zeit gültige Klassifikation, welche nur noch objektive Parameter beinhaltet, von Rowlings 1997 vorgestellt wurde (Rowlings et al. 1997).

Einteilung akuter GvHD nach Schwere - IBMTR

	Haut		Leber		Darm	
Index	Stadium	Exanthem	Stadium	Bili (mg/dl)	Stadium	Volumen
A	1	< 25 %	0	< 2	0	< 500 ml/d
B	2	25,50 %	1-2	2-5	1-2	550-1500
C	3	> 50 %	3	5-15	3	> 1500
D	4	Bullae	4	> 15	4	Schmerz, Ileus

Tabelle 1.1 nach Rowlings 1997

Die prognostische Bedeutung dieser Einteilung zeigt sich in der Tatsache, dass das Überleben mit dem Schweregrad der GvHD korreliert. Bei lokal begrenzter Manifestation liegt das Überleben bei > 90 %, bei schwerster GvHD hingegen bei < 5 % (Cahn et al. 2005).

Der beste Weg eine GvHD zu vermeiden, ist die Reduktion der Risiken, welche eine GvHD begünstigen. Einer der entscheidendsten Faktoren für die Entstehung der GvHD sind HLA-Inkompatibilitäten zwischen Spender und Empfänger, die von T-Zellen erkannt werden und die immunologische Reaktion auslösen (Beatty et al. 1985). Doch auch bei HLA-identischen Spendern und Empfängern kann es aufgrund von Minor-Histokompatibilitätsantigenen zu einem Auftreten einer GvHD kommen (Goulmy et al. 1996). Höheres Alter des Empfängers sowie des Spenders, unterschiedliche Geschlechter von Spender und Empfänger (Weisdorf et al. 1991) als auch Anzahl der transplantierten Stammzellen (Przepiorka et al. 1999) und die Art des angewandten Konditionierungsregimes haben einen Einfluss auf die Entstehung einer GvHD.

Bei bereits vorliegender GvHD sind Immunsuppressiva wie Glukokortikoide in Kombination mit Ciclosporin A oder Methotrexat Therapie der Wahl. Die immunsuppressive Therapie erhöht allerdings das Risiko einer Infektion und das Wiederauftreten der zugrunde liegenden Erkrankung (Couriel et al. 2004).

Doch trotz deutlicher Fortschritte in der Prävention und Behandlung der GvHD zählt sie auch heute noch zu einer der gefährlichsten Komplikationen der HSZT, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht.

1.4 T-Zell-Depletion

Mit der Erkenntnis um die Bedeutung der T-Zellen - insbesondere des Spenders - bei der Entstehung einer GvHD (Korngold & Sprent 1987) war der nächste Entwicklungsschritt, die T-Zellen aus dem Transplantat in vitro zu entfernen bzw. zu modifizieren oder diese in vivo unschädlich zu machen. Erste Studien zeigten dazu, dass hierdurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer GvHD enorm herabgesetzt werden konnte bis hin zu einer vollständigen Vermeidung der Immunreaktion (Champlin et al. 1990; Prentice et al. 1984). Ein Problem, welches sich jedoch aus der Depletion der T-Zellen ergab, war fehlendes Engraftment. Ein weiterer Nachteil lag in einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko der zugrunde liegenden Erkrankung (Horowitz et al. 1990; Martin et al. 1985), da mit dem Verlust der T-Zellen der Hauptmediator der GvL fehlte und die malignen Zellen unzureichend bekämpft wurden.

In Folge dessen lag eine Möglichkeit in der Applikation von Spenderlymphozyten, welche mittels GvL-Effekt zu Remissionen führte (Collins et al. 1992; MacKinnon 2000). Allerdings wurde auch beobachtet, dass DLI eine GvHD auslösten, wobei das Risiko hierfür stieg, je früher die DLI appliziert wurden. Eine Applikation von DLI jenseits des 3. Monats nach Transplantation reduzierte das Auftreten einer GvHD bei erhaltenem GvL-Effekt (Kolb 2008). Dies erklärte man durch das Fehlen eines proinflammatorischen Milieu im Gewebe nach Abheilen der durch die Konditionierung ausgelösten mucosalen Läsionen insbesondere im Gastrointestinaltrakt (s.a. 1.6). Um den gewünschten GvL-Effekt zu forcieren und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer GvHD zu reduzieren, wurden neben dem zeitlichen Ablauf die Art und die Anzahl der DLI modifiziert. Unter anderem aufgrund von Beobachtungen einer erhöhten Zirkulation von CD8⁺-T-Zellen bei der Entwicklung einer GvHD nach T-Zell-depletierter Transplantation (Soiffer et al. 1993) fanden Untersuchungen statt, bei denen ein kleines Patientenkollektiv, welche CD8-depletierte DLI nach Transplantation erhielten, weniger GvHD aufwiesen als Patienten ohne T-Zell-Depletion (Champlin et al. 1990; Nimer et al. 1994). Ähnliche Hinweise fanden sich in Studien von Giralt, der eine geringere Rate an schwerer GvHD bei Patienten mit CD8-depletierter DLI beobachtete (Giralt et al. 1995). Eine niedrigere Dosierung der DLI und die Gabe über einen längeren Zeitraum verteilt, schien dabei einen positiven Effekt auf die GvL-

Reaktion mit gleichzeitiger Verminderung der GvHD zu haben (Mackinnon et al. 1995; Vela-Ojeda et al. 2004).

Ein weiterer neuer Ansatz um die Wirkung einer Transplantat-gegen-Malignom Reaktion (GvM) zu optimieren, ist die Charakterisierung tumorspezifischer Antigene. Vakzinationsstrategien, unter anderem mit antigenbeladenen dendritischen Zellen, können zur Induktion von spezifischen CD8-T-Zellen führen, die eine Malignom-spezifische Immunreaktion bewirken (Thurner et al. 1999).

1.5 Prophylaktische Gabe CD8-depletierter Spenderlymphozyten

Neben experimentellen Modellen zur Verringerung alloreaktiver T-Zellen und der Regenerierung tumorspezifischer T-Zellen wird zur Zeit in Mainz eine klinische Phase I/II-Studie durchgeführt, um die Immunrekonstitution der Patienten nach HSZT zu verbessern (Meyer et al. 2007; Meyer et al. 2010). Hierbei bekommen die Patienten ein dosisreduziertes Konditionierungsregime, entwickelt von der Gruppe Mackinnon et al, welches zuvor in vivo mittels eines anti-CD52 Antikörpers T-Zell-depletiert wurde (Kottaridis et al. 2000). Anschließend werden den Patienten, nach Absetzen der Immunsuppressiva und in Abwesenheit einer GvHD, CD8-depletierte Spenderlymphozyten in ansteigender Dosis infundiert. Unter DLI wiesen die Patienten, bei regelmäßigen Kontrollen der Immunrekonstitution, einen positiven Effekt auf den Spenderchimärismus und die T-Zellimmunität gegen das Zytomegalovirus (CMV) auf. Aufgrund des Auftretens einer akuten GvHD erhielten 35 von 87 Patienten keine Spenderlymphozyten wegen einer früh nach Transplantation aufgetretenen akuten GvHD, während 23 Patienten, welche dem Protokoll folgend CD8-depletierte Spenderlymphozyten bekommen hatten, im weiteren Verlauf eine aGvHD entwickelten. Auffällig dabei war, dass die aGvHD fast ausschließlich die Haut befallen hatte und dies trotz sehr niedriger T-Zellen im peripheren Blut der Patienten. Dies ließ vermuten, dass weitere Faktoren für die Entstehung einer GvHD eine Rolle spielen.

1.6 Stellenwert Antigenpräsentierender Zellen für die GvHD

Unter Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) versteht man hämatopoetische Zellen, die darauf spezialisiert sind zu phagozytieren, Peptidantigene zu prozessieren, diese zu präsentieren und hierdurch eine adaptive Immunantwort regulieren. Je nach Aktivierungszustand können sie sowohl CD4- als auch CD8-positive T-Zellen stimulieren oder eine Aktivierung verhindern. Dies geschieht zum Einen durch die Ausschüttung spezifischer Zytokine und zum Anderen aufgrund der Präsentation der Antigene im Kontext mit sogenannten kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche. Hierbei kann man prinzipiell zwischen zwei unterschiedlichen HLA-Klassen (Humane Leukozyten Antigene) unterscheiden, die beide auf dem Gen des Major Histokompatibilitäts Komplexes (engl.: major histocompatibility complex; MHC) kodiert sind. Einerseits die HLA-Klasse-I, die auf allen Zellen des Körpers exprimiert werden und der Präsentation der in der Zelle synthetisierten Proteine dienen. Kommt es zu einer Mutation oder zu einem Befall der Zelle z.B. durch ein Virus, verändern sich dadurch auch die präsentierten Peptide. Werden diese modifizierten Peptide nun zusammen von einer angeregten APZ präsentiert, kommt es zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD8-T-Zellen), die dann in der Peripherie virusinfizierte Zelle lysieren.

HLA-Klasse-II-Moleküle befinden sich dagegen ausschließlich auf den professionellen APZ. Über HLA-Klasse II präsentierte Antigene aktivieren T-Helferzellen (CD4-T-Zellen) und indizieren damit u.a. eine humorale Immunantwort über die Produktion spezifischer AK.

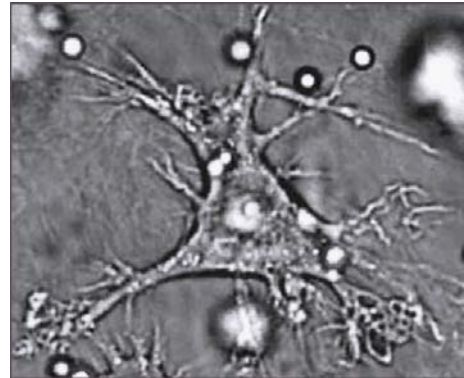
Eine weitere Möglichkeit Antigene zu präsentieren zeigt sich in der Cross-Präsentation, die besonders von Dendritischen Zellen (DZ) durchgeführt wird (Ackerman & Cresswell 2004). Hierbei werden exogen aufgenommene Moleküle endosomal verarbeitet und dann über HLA-Klasse-I gebunden und präsentiert, was - wie oben bereits beschrieben - zu einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen führt und Einfluss auf die Entstehung einer GvHD haben kann (Matte et al. 2004). Zur Cross-Präsentation sind nach heutigem Wissen ausschließlich professionelle APZ fähig.

Zu den Antigenpräsentierenden Zellen gehören B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen. Letztere sind die am effektivsten naive T-Zellen stimulierenden Zellen (Banchereau & Steinman 1998). Diese Fähigkeit wird auch „priming“

bezeichnet. DZ besiedeln in ihrem noch „unreifen“ Zustand hauptsächlich Grenzflächen wie Haut und Schleimhäute und dienen als Außenposten des Immunsystems.

In den 70-er Jahren von Steinmann und Cohn (Steinman & Cohn 1973) entdeckt und benannt nach ihren morphologischen Charakteristika, den Zytoplasmaausläufern (lat.: dendriticus zu dt.: verzweigt), erkannte man bald darauf ihre Wächterfunktion des Immunsystems.

Stoßen Erreger oder fremde Antigene auf die, sich in die Epithelien erstreckenden Ausläufer einer noch unreifen DZ, so werden diese aufgenommen. Anschließend wandern die DZ aus der Peripherie in lokale Lymphknoten und



*Abb.1.3 DZ unterm Mikroskop
(<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/314117>)*

können dort T-Lymphozyten aktivieren (Schuler & Steinman 1985). Je nach Aktivierungszustand kann dieser Prozess auch unterdrückt werden, was folglich eine Initialisierung der T-Zellen verhindert (Toleranzentwicklung). Die Aktivierung von APZ ist zusätzlich zur Erkennung eines „fremden“ Antigens eine Voraussetzung für die Induktion einer T-Zellantwort. Dieses Konzept der Notwendigkeit von „danger“-Signalen wurde von Paula Matzinger postuliert (Matzinger 1994). Inzwischen sind viele Rezeptoren auf der Oberfläche von DZ beschrieben worden, über die Molekülstrukturen („pattern“) zum Beispiel von Mikroorganismen erkannt werden, welche zu einer Aktivierung von DZ führen. Ein wichtiges Beispiel sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) (Lai & Gallo 2008). Während dieser Wanderung durchläuft die DZ einen Reifungsprozess, in der Fähigkeiten, wie die Aufnahme von Antigenen und deren Prozessierung herunter reguliert werden, wohingegen die Produktion kostimulatorischer Faktoren gesteigert wird, da DZ die einmal gebildeten Peptid-MHC-Komplexe nicht mehr verändern (Kampgen et al. 1991).

Dieser Vorgang ist auch maßgeblich an der Entstehung einer GvHD beteiligt. Ferrara beschrieb 1999 (Ferrara et al. 1999) die Genese der GvHD in einem Drei-Phasen-Modell, in dem es zunächst aufgrund der Konditionierung der Patienten zu einer Schädigung des sich schnell regenerierenden Gewebes kommt, welches daraufhin

inflammatorische Zytokine wie u.a. TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor alpha), IL-1 (Interleukin-1) und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor) ausschüttet. Hauptsächlich betroffen sind dabei Haut bzw. Schleimhäute, sowie der Darm und die Leber, da diese Organe aufgrund ihrer Barrierefunktion gegenüber Erregern und Schadstoffen eine hohe Population von APZ aufweisen, welche von den inflammatorischen Faktoren stimuliert werden. Nach erfolgter Transplantation kommt es aufgrund von Major- / Minor-Histokompatibilitätsantigenen (Goulmy et al. 1996) durch HLA-Präsentation von den APZ des Empfängers (Host) zur Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen (Th1) des Spenders (Donor). Daraufhin findet eine komplexe Interaktion u.a. durch Zytokin-aktivierte Effektorzellen wie zytotoxische T-Lymphozyten (zT), Makrophagen (M) und Natürlichen Killerzellen (NK) statt, die zur Zerstörung gesunden Gewebes des Empfängers führen (s. Abb. 1.4).

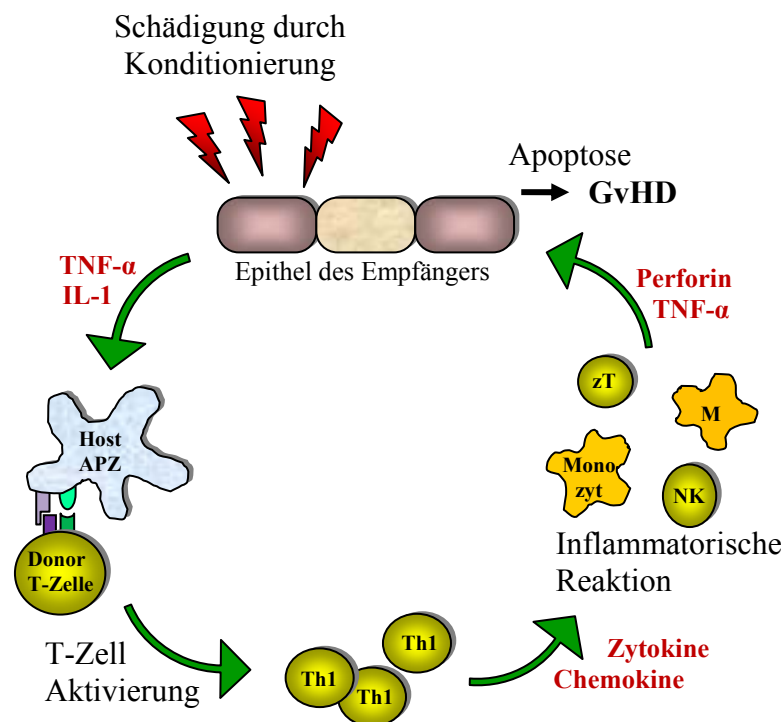


Abb. 1.4 Vereinfachte Darstellung der Hauptfaktoren und des Prozesses zur Entstehung einer GvHD.

Die entscheidende Rolle der APZ wurde durch Versuche seitens Shlomchik bestätigt, in denen das Fehlen von funktionalen MHC-Klasse I Molekülen auf Empfänger-APZ das Auftreten einer akuten GvHD in Mausmodellen unterbinden konnte (Shlomchik et al. 1999). Untersuchungen von Effektor-T-Zellen ergaben, dass diese nach Stimulation zu dem Gewebe zirkulieren und dort Schaden verursachen, wo der Ursprung der sie aktivierenden DZ lag (Mora et al. 2005).

1.7 Die Bedeutung der Langerhans Zelle

Bei Langerhans Zellen (LZ) handelt es sich um noch inaktive epidermal gelegene DZ, deren Aufgabe, ebenso wie bei anderen APZ darin liegt, Antigene nach Kontakt aufzunehmen und zu prozessieren, um diese nach Abwanderung in den Lymphknoten dort den T-Zellen zu präsentieren. Allerdings unterscheidet sich die LZ nicht nur durch ihre Lokalisation gegenüber anderen DZ, sondern auch durch die Anwesenheit von Birbeck-Granula und Langerin, einem an der Zelloberfläche exprimierten Molekül. Die Funktionen der LZ-spezifischen Strukturen sind allerdings noch sehr umstritten. Vermutet wird eine Involvierung in der konventionellen Antigenpräsentation oder auch in der Cross Präsentation (Romani et al. 2003; Valladeau et al. 2000).

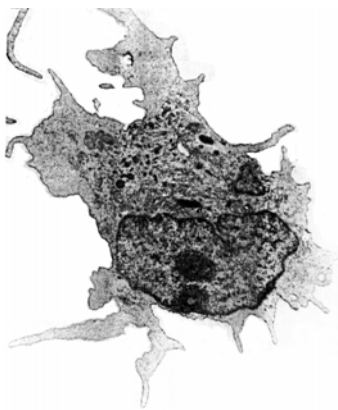


Abb. 1.5 Langerhans Zelle unter einem Elektronenmikroskop (www.infekt.ch/switch/printarticle.php?artID=1644)

Von Paul Langerhans 1868 entdeckt und zunächst fälschlicherweise für eine Nervenzelle gehalten, war es Silberberg, der 1973 den ersten Zusammenhang bei Beobachtungen von Kontaktallergien zwischen LZ und dem Immunsystem knüpfte (Silberberg 1973), was in den nächsten Jahren eine Welle an Untersuchungen nach sich zog. Obwohl die LZ sehr gut untersuchte DZ sind und viele Rückschlüsse aufgrund ihres Verhaltens auf andere APZ gewonnen werden konnten, so ist doch noch recht wenig über den Lebenszyklus der LZ bekannt. Die Funktion der LZ, als wichtigste APZ der Haut (Breathnach & Katz 1987), schätzte man insbesondere beim

Auftreten einer Hypersensibilitätsreaktionen und bei HIV-Infektionen als sehr wichtig ein. Allerdings gibt es erste Zweifel an ihrer Rolle in immunologischen Geschehen, unter Anderem auch durch die Entdeckung epidermaler DZ, welche ebenfalls Langerin exprimieren (Clausen & Kel 2010).

Den Einfluss, den die LZ bei der Entwicklung einer GvHD haben, konnte Merad verdeutlichen, indem sie anhand eines Mausmodells das Verhalten der LZ nach Transplantation untersuchte (Merad et al. 2004; Merad et al. 2002). Einerseits konnte sie zeigen, dass LZ des Empfängers nach T-Zell-depletierter Transplantation sehr lange in der Haut persistierten. Andererseits führte eine allogene Transplantation, d.h. mit dem Vorkommen von T-Zellen im Transplantat, zu einem Austausch der Host-LZ gegen LZ des Spenders. Dieser LZ-Chimärismus, also das Ausmaß des Ersatzes der Host-LZ zu den Donor-LZ, korrelierte sogar mit der Dosis der infundierten T-Zellen. Im Gegensatz dazu wurden die nicht-epidermalen DZ unabhängig von der Transplantation nach spätestens vier Wochen vom Spender ersetzt.

Viel interessanter allerdings war die Reaktion der Mäuse, bei denen die LZ des Empfängers persistierten, da sie nach erneuter T-Zell-Gabe eine deutliche GvHD der Haut entwickelten. Schlussfolgernd konnte gezeigt werden, dass T-Zellen des Spenders in der Lage sind, die LZ des Empfängers zu reduzieren und im Gegenzug dazu den Wechsel hin zu den Spender-LZ zu ermöglichen, was eine Verminderung des Auftretens der GvHD zur Folge hatte. Des Weiteren schienen die verbliebenen LZ des Empfängers in der Haut der Auslöser einer GvHD zu sein, begründet durch die Stimulation der T-Lymphozyten des Spenders, was bereits aufgrund vorheriger Studien vermutet wurde (Shlomchik et al. 1999; Teshima et al. 2002; Zhang et al. 2002).

1.8 Hämatopoetischer Chimärismus

Der Begriff Chimärismus beschreibt den Zustand, dass in einem Organismus Zellen von mindestens zwei verschiedenen Zygotenlinien vorkommen und wurde im Zusammenhang mit Transplantationen erstmals 1956 von Ford benutzt (Ford et al. 1956). Der hämatopoetische Chimärismus beruft sich auf die Anwesenheit von

Lympho- / hämatopoetischen Zellen des Spenders, die nach Stammzelltransplantation im Empfänger nachgewiesen werden können.

Unterschieden wird dabei in der Art des vorherrschenden Chimärismus. Stammen alle hämatopoetischen Zellen, welche nach Transplantation untersucht wurden, von dem Spender, so spricht man von einem kompletten (hämatopoetischen) Chimärismus (engl.: complete chimerism; CC). Beim Vorliegen von Zellen des Spenders sowie des Empfängers handelt es sich um einen gemischten Chimärismus (engl.: mixed chimerism; MC), den man zusätzlich je nach Verlauf in einen auf-/absteigenden Chimärismus aufteilen kann. Allerdings unterliegt der Chimärismus einem steten Wandel und so kann ein kompletter Chimärismus aufgrund des dynamischen Prozesses in einen Gemischten und umgekehrt ein Gemischter in einen kompletten Chimärismus übergehen (Bader et al. 1996; Ramirez et al. 1996). Kommt es zu keinem Anwachsen der Spenderzellen, so zeigen sich in der Chimärismusanalyse nur Zellen des Empfängers, was mit einem Transplantatversagen gleichzusetzten ist.

Die Beurteilung des Chimärismus hat ihre große Bedeutung in der Überwachung der Ansiedlung von Spenderzellen und der Regeneration der Hämato- und Lymphopoese. Mittlerweile bildet der Chimärismus die Basis interventionellen Handelns, zum Einen um eine Abstoßung des Transplantates zu verhindern und zum Anderen um drohende Rezidive mittels forcierter Immuntherapie zu unterbinden (Bader et al. 2005).

So konnte gezeigt werden, dass ein kompletter Spender-Chimärismus das geringste Risiko eines Rezidives aufweist, wohingegen vor allem ein schneller Abfall des Chimärismus von T-Zellen und NK-Zellen Anzeichen eines Rückfalls darstellen (Baron et al. 2004).

Auf der anderen Seite korreliert der komplette Spender-Chimärismus mit dem Risiko für die Entstehung einer GvHD, während ein gemischter Chimerismus mit einem reduzierten Risiko einer GvHD assoziiert wird (Huss et al. 1996; McSweeney & Storb 1999). Doch eine genauere Aussage des prädiktiven Wertes des CC bzw. des MC lässt sich nicht global anwenden, sondern hängt von der zugrunde liegenden Erkrankung und von der zuvor durchgeführten Konditionierung ab (Baron & Sandmaier 2006).

Jedoch machten die Erkenntnisse dieser beobachteten Korrelation die Notwendigkeit einer schnellen und sensitiven Kontrolle des vorhandenen Chimärismus deutlich.

1.8.1 Methoden der Chimärismusbestimmung

Aktuell beruhen die meisten Analysen des Chimärismus auf dem Nachweis polymorpher Abschnitte genomischer DNA (Desoxyribonukleinsäure). Frühere Methoden zur Untersuchung basierten sowohl auf Erythrozyten-Antigenen oder Isoenzymen von Leukozyten, als auch auf dem Restriktions-Fragment Längenpolymorphismus (engl.: restriction fragment length polymorphism; RFLP) (Knowlton et al. 1986).

Erste Fortschritte ergaben sich in der Bestimmung des Chimärismus mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (engl.: fluorescence in situ hybridization; FISH), die mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen bestimmte Bereiche auf dem X/Y-Chromosom markiert (XY-FISH) und auf diesem Weg das Geschlechtschromosom detektiert wird (Durnam et al. 1989). Der Nachteil, der sich aus dieser auch heute noch für bestimmte Fragestellungen angewandten Methode ergibt, liegt in dem Verfahren selbst, welches nur eine Bestimmung eines geschlechtsdifferenten Spenders zulässt.

Der Durchbruch für die klinische Anwendbarkeit der Chimärismusanalysen setzte mit der Entwicklung der PCR (engl.: Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion) ein. Selbst bei kleineren Proben ist es möglich durch eine vorherige Amplifikation mittels PCR die variable Anzahl von Tandemwiederholungen (engl.: variable number of tandem repeats; VNTR) als auch die sich wiederholenden kleinen Mikrosatelliten (engl.: short tandem repeats; STR) in nicht-kodierender genomischer DNA nachzuweisen (Lawler et al. 1991). Diese unterscheiden sich nur in ihrer Anzahl der Basen der sich wiederholenden Sequenz, welche bei den STR eine Basenlänge von 2-7 bp (Mikrosatellit) und VNTR eine von 10-100/150 bp (Minisatellit) beträgt.

Aufgrund der individuellen Variabilität der Anzahl dieser Sequenzen hatte sich die Methode der STR-Analyse zur zweifellosen Zuordnung der DNA-Proben etabliert (Thiede et al. 2004). Ferner ermöglicht dieses Verfahren eine geschlechtsunabhängige Bestimmung des Chimärismus sowie kurz aufeinander folgende Kontrollen nach Transplantation bei allen Patienten.

Eine zusätzliche Methode zur Charakterisierung des Chimärismus, die in ihrer Anwendung an Häufigkeit zunimmt, basiert auf der Detektion von einzelnen Nukleotidpolymorphismen (engl.: single nucleotide polymorphisms; SNPs).

1.9 Single Nucleotide Polymorphisms

SNPs bezeichnen Variationen von einer einzelnen Base auf der DNA. Eine solche Abweichung wird als Polymorphismus bezeichnet, wenn auch die weniger häufige Variante in mindestens einem Prozent der jeweiligen Population vorkommt. Anderenfalls spricht man von einer individuellen Punktmutation (Brookes 1999).

Typischerweise liegen SNPs in zwei Nukleotidvarianten vor, weshalb man sie auch als bi-allelische Marker bezeichnet. In zwei Drittel der Fälle handelt es sich um die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T). Weiterhin wurden auch schon tri- bzw. tetra-allelische SNPs beobachtet, welche aber aufgrund ihres seltenen Auftretens nicht von großem Belang sind.

Durchschnittlich wird ein SNP rund pro 1000 Basenpaare angenommen, sodass man - auf das ganze Genom betrachtet - eine Gesamtzahl von 11 bis 17 Millionen SNPs vermutet (Kruglyak & Nickerson 2001) (Collins et al. 1998). Von Diesen sind bereits über 9 Millionen in öffentlichen Datenbanken publiziert (Rocha et al. 2006).

Die Bedeutung einzelner Polymorphismen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass 90% aller individuellen Variationen der DNA auf SNPs basieren. Daher spielt ihre Erforschung nicht nur in der Forensik zur Feststellung der Identität oder zur Bestimmung des Chimärismusanalyse nach HSZT eine Rolle. Über evolutionsmedizinische Aspekte rückt die Bedeutung individueller genetischer Marker auch im Hinblick auf das Ansprechen von Medikamenten (McCarthy & Hilfiker 2000) und die Ursache von Erkrankungen in den Mittelpunkt des Interesses. Polymorphismen in Zytokingenen spielen bei der GVHD-Entwicklung eine Rolle (Dickinson & Holler 2008). Darüber hinaus entstehen durch SNPs in kodierenden Genabschnitten auch individuelle Antigene, die als mHAgs (Falkenburg et al. 2003) bezeichnet werden.

SNPs können auf unterschiedliche Art und Weise zur Bestimmung des Chimärismus nach HSZT genutzt werden. Polymorphismen genomischer DNA führen z.B. zu auf die Person bezogen unterschiedlichen Schnittstellen für DNA-Restriktionsenzyme, was im Restriktions-Fragment Längenpolymorphismus (RFLP) genutzt wird, um Individuen genetisch zu unterscheiden (Kan & Dozy 1978). Durch die zunehmende Identifikation von SNPs und deren Heterozygotenfrequenz können Menschen heute durch die gezielte Analyse einer Gruppe von häufigen Polymorphismen voneinander differenziert werden, worunter auch die sogenannte Mini-Sequenzierung zählt (Williams et al. 1988). Hierbei

wird mittels eines, direkt vor dem SNP endenden, Primers eine Sequenzierung mit der Primer-Extensionsmethode um genau eine Base durchgeführt (s. 4.9). Durch Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide oder durch eine MALDI-TOF Massenspektrometrie (engl.: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight) wird diese dann nachgewiesen.

Diese Möglichkeiten der Identifizierung macht man sich ebenfalls in der Etablierung SNP-spezifischer PCR-Ansätze zu nutzen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die DNA verschiedener Individuen in einem Gemisch mittels Real-Time PCR quantifiziert werden können (Alizadeh et al. 2002) und sich daher auch zur Chimärismusbestimmung eignet.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Möglichkeit den Spenderchimärismus nach HSZT durch die Sequenzierung von Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) zu bestimmen, ist in den letzten Jahren etabliert worden. Hierzu wurden Polymorphismen charakterisiert, die es erlauben, anhand einer geringen Anzahl von SNPs zuverlässig Spender und Empfänger zu unterscheiden. Allerdings basieren die zurzeit bekannten Verfahren auf genomischer DNA. Die Verwendung genomischer DNA schließt allerdings eine weitergehende Expressions-Analyse der untersuchten Zellen aus. Wir streben daher an, ein SNP-basiertes Verfahren zum Identitätsnachweis zu etablieren, das auf Polymorphismen in exprimierten Genen beruht und daher die Verwendung von cDNA (engl.: complementary DNA, komplementär), sprich kodierende Abschnitte der DNA, anstelle von genomischer DNA erlaubt. Ein weiterer Vorteil der Analyse auf Ebene der cDNA liegt darin, in einem Schritt die Zugehörigkeit zum Individuum und zum Gewebe bestimmen zu können. Vor allem aber ermöglicht dieses Verfahren auch die Betrachtung des Aktivierungszustandes einer Zelle durch die Detektion der von ihr exprimierten Gene. Zielsetzung meiner Arbeit war die Identifizierung von hierfür verwendbaren SNPs. Die Polymorphismen wurden durch Datenbankanalyse anhand ihrer Lokalisation im kodierenden Abschnitt von konstitutiv exprimierten Genen und ihrer Heterozygotenfrequenz vorselektioniert. Zur Amplifikation von SNP-kodierenden Genabschnitten sollte eine spezifische PCR etabliert werden, deren Primer dabei so gewählt wurden, dass das PCR-Produkt mindestens eine Intron-Exon-Grenze überspannte. Anschließend sollte die Expression der SNP-kodierenden Gene in Zellen der Hämatopoese untersucht werden. Um zu prüfen, ob die identifizierten SNPs zuverlässig Individuen unterscheiden können, sollte dies anhand von HLA-identischen Geschwisterpaaren mittels Sequenzierung getestet werden.

3 Material

3.1 Puffer und Lösungen

Blocking-Puffer	BSA (20%)	2,5 ml
	HSA	5 g
	TBS	ad 100 ml
Bromphenolblau	Bromphenolblau (0,25%)	250 mg
	Wässriges Glycerol (30%)	ad 100 ml
Einfriermedium	HSA (20%)	100 ml
	Liquemin (Heparin) 25000 U/ 5 ml	500 µl 150 ml
	X-Vivo-15	
Essigsäure 0,2 N	Essigsäure 96%	11,33 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
FACS-Puffer	BSA (0,1%)	1 g
	PBS	ad 1000 ml
MACS-Puffer	PBS	200 ml
	BSA	1 g
	EDTA	149 mg
Natriumacetat 0,2 N	Natriumacetat	16,4 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
RNA-Probenlaufpuffer	Formamid (deionisiert)	100 µl
	37% Formaldehyd	70 µl
	10 x MOPS	50 µl
	Bromphenolblau 1%	20µl
	Ethidiumbromid 1%	1 µl
	H ₂ O DEPC	ad 500 µl
TAE-Puffer	0,5M EDTA	100 ml
	Eisessig (Essigsäure 96%)	57,1 ml
	TrisBase	242 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

Material

Trypanblaulösung 0,1%ig	Trypanblau H ₂ O	0,1 g ad 1000 ml
10x MOPS	3M Na-Acetat 0,5M EDTA H ₂ O	16 ml 10 ml ad 1000 ml
10xTBE	Borsäure 0,5M EDTA TrisBase H ₂ O	55 g 40 ml 108 g ad1000 ml

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	(Invitrogen, Karlsruhe)
BSA (bovines Serumalbumin)	(Sigma, Taufkirchen)
Destilliertes Wasser	Aqua B. Braun 1000 mL (Braun Ecotainer, Melsungen) Aqua ad iniectabilia 100 mL (Braun, Melsungen)
Dispase II	Dest H ₂ O Qualilab® neutral protease 100mL (Roche, Mannheim)
DMSO (Dimethylsulphoxid)	(Sigma, Taufkirchen)
DNase I/ Typ II	20.000 U (Sigma, Taufkirchen)
DPBS	(Invitrogen, Karlsruhe)
Eindeckmedium	Vectashield mit DAPI H-1200 (Linaris, Wertheim-Bettingen)
Essigsäure	96% (Merck, Darmstadt)
Ethanol absolut	(Carl Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid	(Sigma, Taufkirchen)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	(Sigma, Taufkirchen)
Ficoll (Lymphozytentrennmedium)	LSM 1077 (Biochrom, Berlin)
FCS Gibco	(Invitrogen, Karlsruhe)

Material

Formaldehyd	min 37% (Merck, Darmstadt)
Formamid Hi-Di	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Glycerol	(Merck, Darmstadt)
H ₂ O	(Braun, Melsungen)
Humanalbumin	20% Octalbin (Octaphama, Langenfeld)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt)
NaCl	(Sigma, Taufkirchen)
PBS	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
TBS	(Carl Roth, Karlsruhe)
Trypanblau 0.4%	(Sigma, Taufkirchen)
Trypsin/EDTA 0,05/0,2%	(Invitrogen, Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid 30%	(Merck, Darmstadt)
x-Vivo 15	(Lonza, Köln)

3.3 Geräte

Durchflusszytometrie	FACS Canto™(Heidelberg)
Eismaschine	Scotsman (Enodis, Herborn)
Feinwaage	M3P (Sartorius, Göttingen)
Gelelektrophotograph	Syngene (VWR international GmbH, Darmstadt)
Gelkammer	mini/medi-large (neolab, Heidelberg) Sub-Cell® GT (Bio Rad, München)
Generator	electrophoresis Power supply (Consort, Turnhout, Belgien) Power Pac 300 (Bio Rad, München)
Heizblock	Thermomixer Comfort Grant QBT (Eppendorf, Hamburg)
Hood	Captair® bio (erlab, Köln)

Material

Inkubator, CO ₂ -begast	HERA Cell (Kendro Laboratory Products, Hanau)
Kapillarsequenzierer	ABI Prism 3100 Avant Gentic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Magnet für Zellseparation/MPC-Magnethalter	(Dynal, Hamburg)
Magnetrührer	mit Heizplatte, IKAMAG®RET (IKA-Werke GmbH und Co.KG, Staufen)
Mikroskop	Axiostar 10x, 20x, 40x, 63x (Zeiss, Stuttgart)
MiniMacs	(Miltenyi, Bergisch Gladbach)
PCR-Block	Mastercycler/Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
pH-Meter	inoLab (wtw GmbH, Weilheim)
Photometer	Ultrospec 3000 UV/Visible (pharmacia Biotech, Freiburg)
Photometerküvetten	Ultrospec (Pharmacia Biotech, Freiburg)
Pipetten	0,5-10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000µL (Eppendorf reference, Hamburg)
	20 µl, 200 µl, 1000 µL pipetman (Gilson, Limburg)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu (IBS- integra Biosciences, Fernwald)
	Pipetus-akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000 (peqlab Biotechnologie, Erlangen)
Sterilwerkbank	HS 18 (Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau)
Stickstofftank	Consarctic UN 1977 BSF 110/BSF 350 (Schöllkrippen)
Tiefkühlschrank	-80°C Hera freeze (Kendro Laboratory Products, Hanau)

Material

	-30°C Froster (Kirsch,Offenburg)
	-20°C Premium (Liebherr,Ehingen)
Tischwaage	BP 2100 S (Sartorius, Göttingen)
Trockenschrank	UT 6420 (Heraeus, Hanau)
Vortexer	REAX top (Heidolph, Schwabach)
Wasserbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL,Burgwedel)
Zell-Separation	FACS-Aria™ Cellsorter (BD Biosciences, SanJose USA)
Zentrifuge	Multifuge 15 R (Heraeus, Hanau)
	Megafuge 2.0 R (Heraeus, Hanau)
	Biofuge primo (Heraeus, Hanau)
	Minizentrifuge (Labnet, Oakham, UK)
	Galaxy Mini (Merck, Darmstadt)
	Mikro 200 R Hettich (Labotec, Wiesbaden)
Zellzählkammer	Neubauer (Carl Roth, Karlsruhe)
	Rosenthal (Carl Roth, Karlsruhe)

3.4 Glas- und Plastikwaren

Deckglas	24x50 mm (Fisher Scientific)
Einfrierboxen	Micro Max Storage Box (Nunc, Wiesbaden)
Einfriertubes	NUNC™ Cryo Tube™ vials 1,8 mL (Thermo Scientific, Dreieich)
	Cryo-tags 1,5-2,0 mL (Diversified Biotech, Boston, USA)
Einmal-Pipetten glas	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Greiner bio-one, Frickenhausen)

Material

Eppendorfgefäße	Save-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2ml (Eppendorf, Hamburg)
FACS-tubes	steril 5 mL (Sarstedt, Numbrecht)
Falcon	15 ml, 50 ml (Greiner bio-one, Frickenhausen)
Ficollröhrchen	Leukosep 50 ml Tube (Greiner bio- one, Frickenhausen)
Filterspitzen	steril 0,1-10 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl (Star Lab, Ahrensburg)
Kanülen	0,6x30 mm (BD Microlance, Hidelberg)
Messbecher	250 ml (Simax, Aachen) 100 ml, 250 ml, 1000 ml Duran® (Hirschmann EM Techcolor, Eberstadt)
Multiwellplatte	96-well, steril, U-shape Cellstar (Greiner bio-one, Frickenhausen)
Objekträger	geschnitten, mattrand 76x26 mm (Diagonal, Münster)
PCR-Tubes	0,2 ml flach (Molekular Bioproducts, Thermo Scientific, Dreieich) 0,2 ml gewölbt (Fisher Scientific, Dreieich) 0,5 ml flach (Grainer bio-one, Frickenhausen)
Petrischalen	unbeschichtet, Ø 3,5 cm; 9,4 cm (Greiner bio-one, Frickenhausen)
Pinzetten	(Roth Carl, Karlsruhe)
Pipettenspitzen	0,5-10 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl (Starlab, Ahrensburg)
Rack	Quatro-Rack (Roth Carl, Karlsruhe)
Scheren	(Roth Carl, Karlsruhe)
Skalpell	Einwegskalpell rund/spitz (PFM, Köln)

Material

Spritzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml Ecoject Luer (Dispomed Witt, Gelnhausen)
Sterilfilter	0,2 μm^2 (Whatman Schleicher + Schuell, Dassel)
Zellsieb	Cellstrainer 70 μm^2 BD Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg)

3.5 Antibiotika

Genteticin	G418 50 mg/ml (Gibco, Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin	(Gibco, Karlsruhe)

3.6 Molekularbiologische Materialien

AmpliTaq-DNA-Polymerase-Puffer	
Basenpaarleiter	100-1000bp Äquimolar (Roth Carl, Karlsruhe)
Oligo (dt) Primer	(Qiagen, Hilden)

3.6.1 Enzyme

Ampli Taq DNA-Polymerase	(Roche, Mannheim)
Exo I, Exonuklease I	(USB Corporations, Cleveland, USA)
Hot Start Taq DNA-Polymerase	(Qiagen, Hilden)
SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase	(USB Corporations, Cleveland, USA)

3.6.2 Längenstandards

Genescan 120 LIZ Size Standard	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Internal lane standard 600, ILS600	(Promega, San Luis Obispo, USA)

3.7 Immunomagnetische und FACS-vermittelte Zellseparation

MicroBeads	CD4, CD8, CD14, CD15, CD19 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Trennsäulen	MACS Säulen, 25 MS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

3.7.1 Antikörper (FACS)

CD1a - FITC (Maus-anti-human)	Cat No.555806 (PharMingen) (Becton Dickinson, Heidelberg)
CD1a – PE	Cat No.1972 Monoclonal Antibody (Immunotech, Marseille, Frankreich)
HLA-DR-FITC	(Menarini Diagnostics) Cat No.1638 (Immunotech, Marseille, Frankreich)
IgG1 FITC - IgG1 PE human AK	(Beckmann Coulter - Immunotech, Krefeld)
IgG1(Mouse)-FITC/IgG1(Mouse)-PE	Ref A07794 (Immunotech, Krefeld)

3.7.2 Antikörper (Zytospin)

Goat-anti-mouse Alexa 488	(Invitrogen, Karlsruhe)
CD1a - FITC (Maus-anti-human)	(Becton Dickinson, Heidelberg)

3.8 Kits

ABI PRISM SnapShot Multiplex Kit	(Applied Biosystems, Darmstadt)
AmpFISTR® SEfiler Plus™ PCR Amplification Kit	(Applied Biosystems, Darmstadt)
BigDye ^R Rhod. Kit v3.1 Cycle Sequencing	(Qiagen, Hilden)
High Pure RNA Isolation Kit	(Roche, Mannheim)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	(BioRad, München)

Material

Multiplex PCR Kit	(Qiagen, Hilden)
PCR Purification Kit	Qiaquick (Qiagen, Hilden)
SuperScript™, RT PCR	(Invitrogen, Karlsruhe)

3.9 Software und Internetseiten

ABI Prism GeneScan Analysis Software

DNASar

FastPCR - Primerinteraktionen

Oligonucleotide Properties Calculator

Stand 19.06.2011

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

Primer 3

Stand 19.06.2011

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)

Pubmed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

SymAtlas

Stand 19.06.2011

(<http://biogps.gnf.org/?symatlas=/SymAtlas/symform%3f#goto=welcome>)

4 Methoden

4.1 Gewinnung von Langerhans Zellen

Die Isolierung von Langerhans Zellen beruhte zum Teil auf dem Prinzip der Ausschwemmung aus der Epidermis mit Hilfe eines Kulturmediums und der anschließenden Separation mittels Dynabeads. Unsere Arbeitsgruppe modifizierte dieses Verfahren durch Herstellung einer Zellsuspension, aus der zunächst die Isolation der Langerhans Zellen mit einer Magnetischen Zell-Separation (MACS) optimiert wurde, wir dann aber die Zellen unter Verwendung von einer Durchflusszytometrie gewannen, was die Reinheit und die Ausbeute enorm verbesserte.

Für die Verwendung von bei Operationen anfallender Überschusshaut wurde ein Studienprotokoll *„Präklinisches Forschungsprojekt zum Thema: In vitro Untersuchungen an Haut- und Blutproben von Probanden im Rahmen der Transplantationsimmunologie“* von der lokalen Ethikkommission approbiert [837.227.05 (4885)].

Des Weiteren untersuchten wir Hautbiopsien mit einem Durchmesser von 6mm von Patienten vor bzw. nach Transplantation. Die Hautbiopsien für eine prospektive Untersuchung vor und nach allogener Blutstammzelltransplantation wurden im Rahmen von *„Untersuchungen zur Rekonstitution des Immunsystems in Patienten nach Stammzelltransplantation“* [837.185.00 (2551)] von der zuständigen Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz approbiert.

4.1.1 Isolierung der Langerhans Zellen

Zunächst wurde die in NaCl oder PBS überführte Hautbiopsie vom Unterhautfettgewebe befreit und die Haut mit Hilfe eines Skalpells in ca. 4 x 4 mm kleine Stücke geschnitten, von Patienten gewonnene Hautbiopsien wurden gedrittelt/gevierteilt.

Zum Lösen der Epidermis von den übrigen Hautschichten benötigte man ein Dispase-Medium, welches aus X-Vivo 15 (5ml), Penicillin/Streptomycin 10µ/ml (50 µl), 10% FCS (500 µl) und aus Dispase 2 (24 mg) hergestellt worden ist. Die Hautstücke wurden

dann in diesem Medium für 2 h in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte man mit Hilfe einer Pinzette die Epidermis, welche dunkler gefärbt war als der Rest der Haut, problemlos von der Dermis ablösen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale überführen und dort waschen, da das im Medium enthaltene Serum den nächsten Schritt, den Trypsinverdau, behindert. Zudem ließen sich in der Petrischale die oben schwimmenden Epidermisstücke vom unten liegenden Fettgewebe sehr leicht unterscheiden.

Handelte es sich nun allein um die Gewinnung von Langerhans Zellen aus größeren Hautstücken, so wurden alle Epidermisstücke weiter zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet, aus der die Langerhans Zellen dann mit Hilfe der Durchflusszytometrie isoliert werden konnten.

4.1.2 Einzelzellsuspension

Nachdem die Zellen der Epidermis nun durch eine 0,05%ige Trypsinlösung erneut 2 h im Wasserbad bei 37°C voneinander getrennt wurden, stoppte man diesen Vorgang in einer Petrischale durch ein Gemisch aus DNase-1 (250 µl), X-Vivo 15 (4 ml) und FCS (1 ml). Mittels einer 20 ml Spritze wurde die Epidermis kräftig resuspendiert, damit sich die restlichen Zellverbindungen voneinander lösen konnten. Dieser Vorgang ist ein wichtiger Schritt, welcher über die Quantität der Zellen bestimmt, da hierbei noch relativ große Epidermisstücke leicht übersehen werden können. Die Zellsuspension wurde danach über einen 70 µm Filter gegeben, mit X-Vivo 15 nachgespült, bei 1000 Umdrehungen pro Minute (upm) für 8 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurden 20 µl der Zellen zur Zählung in einer Neubauer bzw. einer Fuchs-Rosenthal Kammer entnommen.

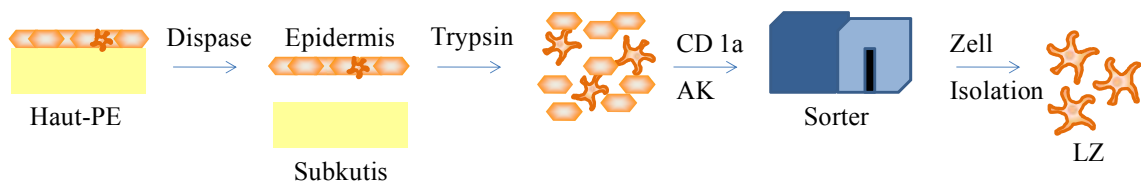


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Isolierung von Langerhanszellen aus Hautbiopsien.

4.2 Durchflusszytometrie

Anschließend erfolgte die Isolierung der Langerhans Zellen aus der Suspension unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie FACS (engl.: fluorescence activated cell sorting) genannt. Nach Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (AK), können Zellen anhand der Fluoreszenz quantifiziert und / oder isoliert werden.

Die in PBS gewaschenen Zellen wurden mit AK, je 1,5 µl HLA DR-FITC (Fluorescein Isothiocyanate) und CD1a-PE (Cluster of Differentiation) (bei größeren Zellzahlen auch je 4,5 µl) markiert und 30 min im Kühlschrank inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, erfolgte eine Waschung mit sterilem FACS-Puffer, bevor die Zellen dann mit 1 ml sterilem 2 mMol EDTA+PBS über ein 50 µm Zellsieb in ein steriles FACS-tube überführt wurden.

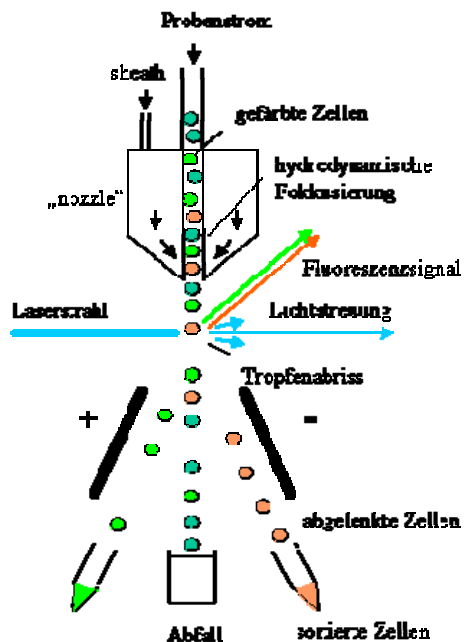


Abb. 4.2 Darstellung einer Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie. (<http://www.facs-lab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

Zum Sortieren der - aufgrund ihrer Eigenschaft ausgewählten - Zellen wird die Kanüle, welche die Zellen am Laser vorbei leitet, am Ende zur Vibration angeregt und der Flüssigkeitsstrom zerfällt in einzelne Tröpfchen. Diese werden je nach Fluoreszenz der Zelle elektrisch positiv oder negativ geladen, was dann in einem elektrostatischen Feld zu einer ladungsabhängigen Ablenkung der einzelnen Tröpfchen führt und diese in unterschiedlichen Reagenzien aufgefangen werden.

Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass die markierten Zellen mittels Überdruck (hydrodynamische Fokussierung) einzeln durch einen Laser angeregt werden und der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Licht in einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Ferner lassen sich unabhängig von der Fluoreszenz Informationen z.B. über Größe des Zellkerns oder auch über die Granularität des Zytoplasmas erstellen.

Zum Sortieren der - aufgrund ihrer Eigenschaft ausgewählten - Zellen wird die Kanüle, welche die Zellen am Laser vorbei leitet, am Ende zur Vibration angeregt und der Flüssigkeitsstrom zerfällt in einzelne Tröpfchen. Diese werden je nach

Die Durchlaufzeit ist dabei von der gewünschten Ausbeute und insbesondere von der Reinheit der Subpopulation abhängig. Jene kann dann auch - nach abgeschlossenem Sort-Vorgang - durch eine Reanalyse der isolierten Zellen bestimmt werden, was unsererseits regelmäßig bei nicht zu geringen Zellzahlen (> 500 Zellen) durchgeführt worden ist.

4.3 Immunfluoreszenzfärbung von Langerhans Zellen

Bei Hautbiopsien von Patienten wurden ca. 2/3 der Epidermis wie oben beschrieben zu einer Einzelzellsuspension weiter verarbeitet und Langerhans Zellen dann sortiert. Das restliche Drittel wurde für die Immunfluoreszenzfärbung der Langerhans Zellen verwendet.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht auf der Affinität von Antikörpern zu bestimmten Gewebeeigenschaften. Da Langerhans Zellen die einzigen Zellen der Epidermis sind, die an ihrer Oberfläche CD1a-positiv sind (Fithian et al. 1981), können diese AK spezifisch für die LZ-Färbung verwendet werden. Auf diesen sog. Primär-AK bindet nun noch ein weiterer AK, der Sekundär-AK, welcher mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Dieser Sekundär-AK entspricht dem eingesetzten Alexa Fluor 488 Anti-Mouse-AK, der unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer spez. Emissionswellenlänge grün fluoresziert. Zusätzlich verwandten wir ein an die DNA bindendes Medium, das Eindeckmedium mit DAPI (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole), mit dessen Hilfe man den Zellkern bei 460 nm, blau fluoreszierend, sehr gut darstellen kann. Des Weiteren schützt es vor zu schnellem Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes.

Zu Beginn wurde eine Ausbuchtung einer 96 Loch-Platte mit Blocking-Puffer für 30 min inkubiert, um die Oberflächenbeschaffenheit des Wells für die AK zu beschichten, damit diese nicht an der Platte hängenblieben. Nun wurde das Epidermisstück in einem 1,5 ml Eppi durch 500 µl Aceton, welcher zuvor auf -30°C gekühlt wurde, für 15 min auf Eis fixiert.

Der sich in der Ausbuchtung befindliche Blocking-Puffer wurde durch 150 µl TBS ersetzt und die fixierte Epidermis darin für fünf min inkubiert. Aufgrund des

Austausches des alten TBS durch erneut 150 μ l frischen TBS und der fünfmaligen Wiederholung dieses Vorganges erfolgte die Waschung der Epidermis, bevor sie wiederum 30 min bei 150 μ l Blocking-Puffer unter Raumtemperatur (RT) inkubierte.

Anschließend wurde der Blocking-Puffer durch 50 μ l einer 1:100 in FACS-Puffer verdünnten CD1a-FITC AK-Lösung substituiert und die Epidermis über Nacht im Kühlschrank belassen.

Tags darauf erfolgte abermals eine Waschung mit 150 μ l TBS und fünfminütiger Inkubation, die weitere viermal wiederholt wurde, indem beim Wechsel immer wieder auf und ab pipetiert wurde, um möglichst alle überschüssigen AK wegzuspülen.

Nach einer nochmaligen Inkubation in 150 μ l Blocking-Puffer für 30 min bei RT, wurde der Puffer durch 50 μ l einer 1:200 in FACS-Puffer verdünnten Alexa Fluor 488 AK-Lösung ersetzt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Einer erneuten fünfmaligen Spülung mit TBS (s.o.) folgte eine zweifache Reinigung mit PBS.

Die gewaschene Epidermis wurde nun in eine Petrischale mit PBS überführt und mit Hilfe einer Pinzette oder einer Pipettenspitze auf einen im PBS eingetauchten Objektträger vorsichtig aufgeladen, sodass sich keine Falten oder Luftblasen bildeten. Das überschüssige PBS wurde durch saugfähiges Papier entfernt und das Epidermisstück mit Vectashield mounting medium with DAPI auf dem Objektträger eingedeckelt, welches unter UV-Anregung blaues Licht emittiert und konservierend wirkt.

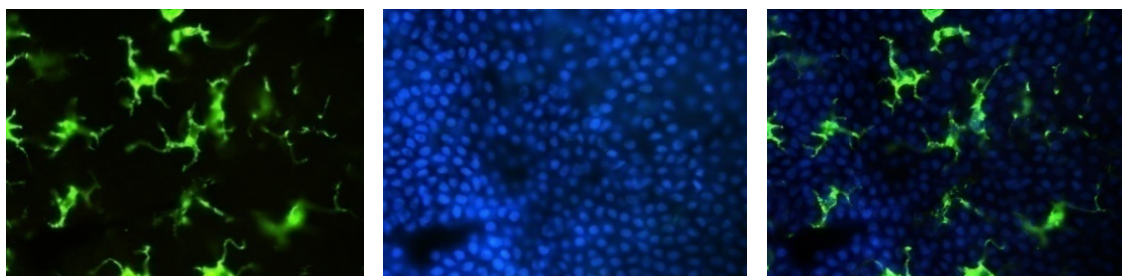


Abb. 4.3 Epidermisfärbung der LZ mit CD1a-FITC und Alexa Fluor 488 bei 63xfacher Vergrößerung. Links: Alexa-Filter, Darstellung der Zelloberfläche, Mitte: DAPI-Filter, Darstellung der Zellkerne, Rechts: Overlay von Alexa und DAPI.

4.4 Immunomagnetische Separation

Die Magnetische Zell Separation (engl.: Magnetic Cell Separation; MACS) wurde in dieser Arbeit zur Isolierung von Zellen des peripheren Blutes genutzt, wie CD4, CD8, CD15 und CD19, welche dann zur Bestimmung der Gewebeexpressivität der Housekeeping-Gene heran geführt wurden.

Das Prinzip dieses Verfahrens sind magnetbeadgekoppelte AK, die sich zellspezifisch an die Oberflächenmoleküle heften. Die markierten Zellen der Suspension werden dann über eine Säule gegeben, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Beladene Zellen werden so in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen ungehindert durchfließen. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können die verbliebenen Zellen eluiert werden (positive Selektion).

Für die Isolation wurden 1×10^7 zuvor aufgetaute und gewaschene Zellen mit 20 μl der jeweiligen Mikrobeads und 80 μl MACS-Puffer zusammen 15 Min im Kühlschrank inkubiert. Nach erfolgter Waschung mit dem 20-fachen an Volumen mit MACS-Puffer wurde die Suspension über die bereits mit 500 μl Puffer gespülte Säule gegeben. Die Säule wurde erneut dreimal mit 500 μl MACS-Puffer gespült, ehe sie aus dem Magneten entfernt und mit dem Stempel zweimal zügig mit 1 ml MACS-Puffer ausgedrückt worden ist. Um eine höhere Reinheit der Zellen zu erreichen, konnte man die Zellen nach Zentrifugation erneut über eine neue Säule laufen lassen. Die hierbei benötigten Mikrobeads sowie die MiniMACS-Säulen wurden von der Firma Miltenyi verwendet.

4.5 Ficoll-Dichtezentrifugation

Um die als Ausgangsmaterial für viele spätere Analysen dienenden PBMCs (engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cell; dt.: periphere Blut-Monozyten) aus dem Blut isolieren zu können, bedienten wir uns der Dichtegradientenzentrifugation, der sog. Ficoll-Separation. Dieses Verfahren beruht auf der Trennung der Zellpopulationen des Blutes mit Hilfe eines Separationsmediums (Ficoll), welches eine spezifische Dichte (1077 g/cm^3) aufweist und sich bei einer Zentrifugation alle Blutbestandteile mit höherer Dichte am Boden als Pellet ansammeln (Erythrozyten und Granulozyten).

Wiederum andere Bestandteile ordnen sich aufgrund der auf sie einwirkenden Zentrifugalkraft und ihrer geringeren Dichte in Phasen oberhalb des Mediums an. Die hierbei entstehende oberste Phase ist Plasma (1026 g/cm^3), wohingegen die Interphase zwischen Plasma und Ficoll aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten ($1058\text{-}1070 \text{ g/cm}^3$) besteht.

4.5.1 Fraktionierung

Zu Beginn wurden 15 ml des Lymphozytentrennmediums, welches einem synthetischen Polysaccharid entspricht, aufgebaut aus stark verzweigten Saccharosemonomeren und kreuzvernetztem Epichlorhydrin, in das Leukosep-Röhrchen vorgelegt und kurz anzentrifugiert, sodass das Ficoll unter die Fritte (Trennstoff) gelang. Danach wurden max. 30 ml des EDTA-Vollblutes pro Tube bei 2000 upm für 15 min ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Die so entstandene Interphase, welche sich als weißer Ring zwischen Plasma und Ficoll darstellte, wurde abpipettiert und zusammen mit der gleichen Menge an PBS (20 ml) bei 1800 upm für 10 min (ab nun wieder mit Bremse) zentrifugiert. Restliche Thrombozyten und Ficollreste wurden durch erneute Waschungen entfernt, bevor dann alle Zellen in einem Falcon gesammelt und zur Zählung der Zellen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt wurden. Nach einer weiteren Reinigung bei 1200 upm für 5 min wurden je nach Zellzahl $1 \times 10^6\text{-}1 \times 10^7$ Zellen pro Nunc mit einem Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) im Stickstofftank gelagert.

4.6 RNA - Isolierung

Da die weiteren Untersuchungen mit Hilfe von cDNA durchgeführt wurden, musste zunächst die RNA (Ribonukleinsäure) aus den zu untersuchenden Zellen gewonnen werden. Dafür wurden die tiefgefrorenen Zellen vorsichtig aufgetaut und in einem Gemisch aus 1 ml FCS und 3 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 1500 upm zentrifugiert. In Ansätzen von $1\text{-}5 \times 10^6$ Zellen pro Säule wurde die Extraktion der RNA anhand des High Pure Isolation Kit von Roche nach Anleitung fortgesetzt. Dieses Verfahren basiert auf der sogenannten single-step-Methode (Chomczynski & Mackey

1995; Chomczynski & Sacchi 1987). Initial werden die Zellen durch die Inkubation in einem speziellen Puffer lysiert und es erfolgt zeitgleich eine Inaktivierung der RNasen. Mittels eines chaotropen Salzes werden die Nukleinsäuren an ein Glasfaserfließ gebunden und verbliebene DNA durch eine DNase I abgebaut. Am Ende wird nach mehreren Waschungen die Gesamt-RNA eluiert, welche entweder in RNase-freiem Wasser (25 µl/Ansatz) bei -80°C gelagert oder gleich zu cDNA weiter verarbeitet werden kann (Mülhardt 2003b).

4.7 Synthese der cDNA

Bei der Herstellung der cDNA macht man sich die Aktivität eines Enzyms von Viren zu nutze, welches die Fähigkeit besitzt, der RNA komplementäre DNA zu generieren. Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgte zu Beginn mit dem SuperScript II Kit, im späteren Verlauf mittels iScript™ cDNA Synthesis Kit, da sich Vorteile in der Handhabung ergaben.

Mit dem SuperScript II Kit wurde die als Ausgangsmaterial dienende Gesamt-RNA (bis zu 8 µl/Ansatz) in Anlehnung an die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Hinzugefügte Primer konnten sich beim langsamen Abkühlen anlagern und mit Hilfe von weiteren Substanzen wie dNTPs, MgCl₂, Oligo-dTs, Puffer, H₂O und RNase-Inhibitoren fügte die Reverse Transkriptase, bei Temperaturen um die 42°C, die cDNA zusammen. Zum Abschluss wurde die verbliebene RNA durch die RNase H verdaut und die reine cDNA (20 µl/ Ansatz) bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt (Mülhardt 2003a).

Ansatz	Menge	Dauer (min)	Temp. (C°)
RNA-Template	10 µl	5	25
Nukleasefreies Wasser	5 µl	30	42
5x iScript Reaktion Mix	4 µl	5	85
iScript Reverse Transcriptase	1 µl	4	RT

Tab. 4.1 und 4.2 Hier zu sehen der Ansatz des neu verwandten iScript™ cDNA Synthesis Kits, bei dem alle benötigten Materialien von Beginn an in nur einem Schritt zusammen in dem rechts beschriebenen Programm amplifiziert werden.

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine von Mullis 1985 (Mullis et al. 1986) entdeckte invitro-Technik zur exponentiellen Vervielfältigung eines spezifischen Genfragmentes auf der DNA. Die Amplifizierung der DNA erfolgt durch sich zyklisch wiederholende Reaktionsschritte, der Denaturierung, der Annealingphase und der Elongation.

Während der Denaturierung wird die DNA auf Temperaturen um die 96°C erhitzt, wodurch sich die Wasserstoffbrückenbindungen trennen und sie als Einzelstrang vorliegt. In der Annealingphase lagern sich nun zwei sequenzspezifische Oligonukleotide, sog. Primer, an die DNA und definieren das zu amplifizierende Fragment. Die Temperatur der Annealingphase bewegt sich meist um die 55-65°C, da sie abhängig ist von der Schmelztemperatur der Primer und der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Bereiches. Mittels einer DNA-Polymerase wird nun in der Elongation die DNA von den Primern ausgehend mit dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphat) komplementär synthetisiert, sodass am Ende der Elongation (im optimalen Fall) zwei identische doppelsträngige DNA-Abschnitte vorliegen. Durch die Wiederholung dieser Phasen entstehen nach Abschluss der im Durchschnitt 30 Zyklen eine Anzahl von $1,3 \times 10^6$ - $4,6 \times 10^7$ Vervielfältigungen je nach Einsatz an Material und Qualität der PCR.

In dieser Arbeit wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz	Menge
10x AmpliTap-DNA-Polymerase-Puffers	12,5 µl
dNTPs	2 µl
AmpliTaQ-Polymerase	8,5 µl
Forward	2 µl
Reverse-Primer	1 µl
DNA	1 µl
H₂O	17,4 µl

Tab. 4.3 Ansatz einer PCR

Dieser Reaktionsansatz durchlief in einem Thermocycler zunächst 94°C bei 3 min, woraufhin 34 Zyklen von den drei aufeinanderfolgenden Schritten, 94°C für 45 s, 60°C

für 45 s und 72°C für 1 min stattfanden bevor am Ende das Tube erneut bei 72° für 10 min erhitzt wurde. Zur Kontrolle der Qualität und der Länge des PCR-Produktes konnte dieses auf einem Agarose-Gel aufgetragen werden.

4.8.1 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese kann man sehr effizient DNA-Fragmente ihrer Größe nach trennen und identifizieren. Das Prinzip besteht darin, dass die negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente in dem Gel, welches in einem elektrischen Feld angelegt und mit Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; TAE) umgeben ist, Richtung Kathode wandern. Kleinere Fragmente gelangen dabei leichter durch das aus Agarosepolymeren bestehende Gel und bewegen sich schneller in Anoden-Richtung als die größeren Moleküle.

Zur Herstellung eines 1,8 %-igen Agarosegels wurde zunächst 5,4 g des Agarosepulvers mit TAE-Puffer auf 300 ml aufgefüllt und dieses zum Kochen gebracht. Mit 15 µl Ethidiumbromid versetzt, wurde es dann in eine Gelkammer gegossen und ausgehärtet. Für den Lauf wurde das zu untersuchende PCR-Produkt nach Anfärbung in die Gelkammern überführt und mittels einer DNA-Leiter, welche DNA-Abschnitte unterschiedlicher Länge, angefangen von 100 bis hin zu 10.000 Basenpaaren beinhaltet, auf ihre Länge hin verglichen.

Höhere Konzentrationen der Agarose erlauben eine bessere Auftrennung der Fragmente, da den Molekülen das Durchwandern erschwert wird, diese langsamer laufen und Längenunterschiede besser dargestellt werden.

4.8.2 Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine PCR, in der mehrere Amplifikationen auf einem DNA-Template gleichzeitig statt finden.

Zunächst wurde ein Primer-Mix aus den spezifischen Primerpaaren für die zu amplifizierenden DNA-Fragmente im Verhältnis 1:50 mit DNase-freiem Wasser hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die mittels Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) identifizierten

Primersequenzen keine zu großen Interaktionen (FastPCR) untereinander erwarten ließen (s.a. 5.3). Unter weiterer Zuhilfenahme des Multiplex PCR-Kits von Qiagen ergab sich folgender Ansatz:

Ansatz	Menge
MPI MM2x	12,5 µl
Primer-Mix	2 µl
H₂O	8,5 µl
cDNA	2 µl

Tab. 4.4 Ansatz einer Multiplex-PCR

Die Vervielfältigung erfolgte mit Hilfe einer Touchdown-PCR. Das heißt, dass die Annealingtemperatur während der Amplifikation schrittweise reduziert wird, was eine höhere Spezifität der Primer zur Folge hat. So durchläuft der Ansatz zunächst 9 Zyklen bei Annealingtemperaturen von 60°C bis zu 56°C und danach weitere 26 Zyklen mit nebenstehenden Schritten: 30 s bei 96°C, 45 s bei 59°C und 30 s bei 72°C und zum Abschluss die Elongation für 10 min bei 72°C.

4.8.3 Aufreinigung des Multiplex-PCR-Produktes

Um überschüssige Primer, nicht gebundene Nukleotide und restliche Detergenzien, welche bei nachfolgenden Schritten/Analysen zu Komplikationen führen könnten, zu beseitigen, wurden diese mit einer Exonuklease (EXO I) und der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) gereinigt.

Zum Ansatz (Tab. 4.5) wurden 7,5 µl des Multiplex-PCR-Produktes hinzugefügt und bei 37°C für 60 min verdaut.

Ansatz	Menge
10x SAP-Puffer	0,18 µl
SAP	1 µl
EXO I	0,2 µl
H₂O	1,62 µl

Tab. 4.5 Ansatz zur Aufreinigung einer Multiplex-PCR

Im Anschluss daran erfolgte die Inaktivierung der Enzyme bei 72°C für 15 min, womit die Probenvorbereitungen zur Mini-Sequenzierung abgeschlossen waren.

4.9 Mini-Sequenzierung

Die Mini-Sequenzierung ist ein Verfahren, welches eine punktuelle Mutation in der DNA, einen einzelnen Nukleotid Polymorphismus (engl.: Single Nucleotide Polymorphism; SNP) verifizieren kann. Sie beruht auf dem Prinzip der Primer-Extensions-Methode, wobei die Erweiterung um nur ein Basenpaar erfolgt. Oligonukleotide, sog. Mini-Sequenzierungs-Sonden, die mit Hilfe des Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) wurden so ausgewählt, dass sie genau eine Base vor Lokalisation des jeweiligen SNPs an die hybridisierte DNA binden. Analog zur PCR wird nun mittels einer DNA-Polymerase amplifiziert, wobei ausschließlich ddNTPs (Didesoxyribonukleotidtriphosphat) eingesetzt werden. Dies erlaubt die Extension um eine Base an der Sonde. Zum Nachweis sind diese Abbruchnukleotide je nach Base unterschiedlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Des Weiteren ist es möglich durch die Längendifferenz der Mini-Sequenzierungs-Sonden um mind. vier Basen und der anschließenden Bestimmung durch die Kapillargelelektrophorese mehrere SNPs gleichzeitig in einem Reagenz untersuchen zu können.

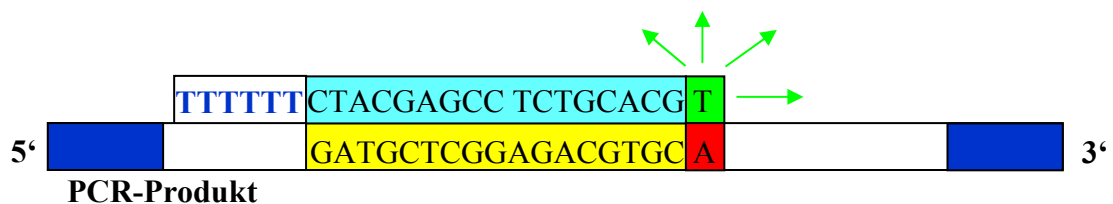


Abb 4.4 Schematische Darstellung eines amplifizierten PCR-Produktes, an das sich die Sonde (hellblau) angelagert hat. Ein oligo d-T-Schwanz an der Sonde ermöglicht hierbei die Längendifferenzierung und damit die Unterscheidung der Sonden mittels Kapillargelelektrophorese. Der Einbau des zum SNP (rot) komplementären ddNTP (grün) kann durch die Fluoreszenzmarkierung detektiert werden.

Multiplex	Gene der Sonden	PCR-Produkt (Basenpaare)	pmol/ μ l
1	AP1B1-765	536	1,5
	AP1B1-051	364	0,75
	BSG-637	432	1
	ID3-096	374	1,5
	PGD-567	267	0,25
	PTTG1IP314	431	0,25
2	BTBD2-045	210	0,75
	DDOST-704	419	2
	GOT2-636	262	2
	PTOV1-996	477	1
3	LASP1-989	453	1,25
	MCM3AP-181	397	1,5
	RPN1-697	312	0,25
	TACC1-586	497	2
4	CKB-505	327	1,5
	CKB-283	327	2
	MCM3AP-173	396	1
	MCM3AP-450	468	2,25
	NFKBIA-696	545	0,25
	NFKBIA-904	545	0,25
5	GOT2-842	351	3
	MRPL9-480	495	1
	POLR2L591	301	1
	TFRC-672	257	0,25
6	DAD1-621	382	0,5
	LDLR-925	351	0,75
	SART1-435	323	0,25
7	SART1-118	430	0,75
	SRP14-208	414	1
	TCEB2-855	482	1

Zu Beginn wurden die Mini-Sequenzierungs-Sonden in einem Verhältnis von 1:100 mit DNase-freiem Wasser zu einem Mix verdünnt (1 pmol/ μ l). Je nach Signalstärke in der Mini-Sequenzierung musste dieses Verhältnis gelegentlich angepasst werden, sodass sich hieraus je nach zusammen gefügter Multiplex ein bestimmtes Mischungsverhältnis ergab (siehe Tabelle 4.6).

Tab. 4.6 Veranschaulicht sind die 7 Multiplex-Ansätze mit Angaben der Gene mit den 3 letzten Ziffern des betreffenden SNP, Produktlänge und der jeweiligen Konzentration in pmol/ μ l.

Zusammen mit 1,5 μ l dieses Sonden-Mixes und 2,5 μ l eines SnapShot-Mixes durchliefen 1,5 μ l des verdauten Multiplex-PCR-Produktes 30 Zyklen in jeweils drei aufeinanderfolgender Phasen von 10 sec bei 96°C, 5 sec bei 56°C und 30 sec bei 60°C, bevor eine erneute Reinigung mittels 1 μ l SAP bei 37°C für 60 min mit anschließender Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 72°C stattfand.

In Vorbereitung der Analyse mit der Kapillarelektrophorese wurden zu 2 μ l des gereinigten Produktes noch 12 μ l HIDI-Formamid und 0,5 μ l eines internen Längenstandards (LIZ 120) hinzugefügt. In Abbildung 4.3 ist eine mit dem ABI PRISM

3100 Genetik Analyzer durchgeführte und mittels GeneMapperID analysierte Mini-Sequenzierung zu sehen. Je nach Länge der Sonden sind farbig markierte Balken, sog. Bins, in Erwartung der jeweiligen SNP-kodierten Base hinterlegt. Sind zwei Peaks bei einem SNP zu erkennen, so ist das Genom heterozygot (z.B. SART1 im oberen Profil, blau und grün), wird nur ein Peak angezeigt, so liegt eine Homozygotie vor (z.B. SART1 im unterem Profil, blau). Im Beispiel der SNPs FAU und CFL1 wurde immer nur eine Base gemessen (C), sodass kein zweiter Bin dargestellt worden ist und diese daraufhin für weitere Untersuchungen herangezogen worden sind.

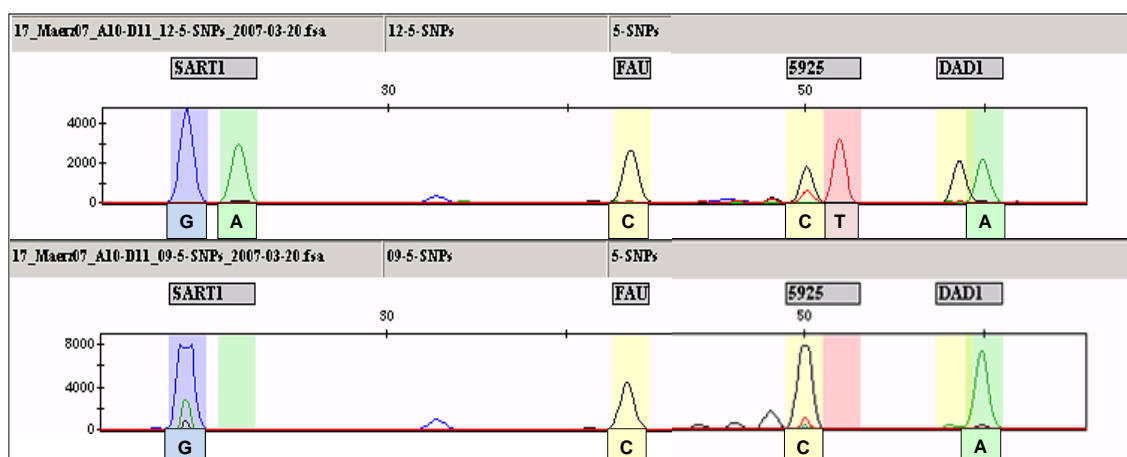


Abb. 4.5 Auswertung einer Mini-Sequenzierung mit zwei unterschiedlichen SNP-Profilen.
 Oben: SART1 - G (blau)/A (grün), Fau - C (gelb)/C, LDLR-5925 - C/T (rot),
 DAD1 - C/A; Unten: SART1 - G/G, Fau - C/C, LDLR-5925 - C/C, DAD1 - A/A

4.10 Sequenzierung

Die Entschlüsselung der DNA-Sequenz, d.h. die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge innerhalb eines DNA-Abschnittes wurde 1977 durch zwei parallel entwickelte Technologien erst richtig möglich. Die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert 1977) erfolgte durch einen chemischen Abbau der DNA, während Sanger (Sanger et al. 1977) DNA enzymatisch neu erzeugte und diese dann analysierte. Im späteren Verlauf setzte sich insbesondere aufgrund der Automatisierbarkeit, der Qualität der Sequenzen und der längeren Leseweite die Sanger-Sequenzierung durch.

4.10.1 Kettenabbruch-Methode nach Sanger

Die Grundlage der Sequenzierung nach Sanger ist die Synthese eines DNA-Stranges, welcher zu einer einzelsträngigen DNA-Vorlage komplementär ist. Hierzu baut eine DNA-Polymerase, ausgehend von einem kurzen Startermolekül (Primer) komplementär zu der Matrize Basen ein, die dNTPs (aller vier Basen – dATP, dCTP, dGTP, dTTP), wobei sich in vier aufgeteilte Reagenzien jeweils alle dNTPs und immer nur ein ddNTP einer Base (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) befindet (s. Abb. 4.6).

Die dNTPs besitzen an ihrem 3`C-Atom eine OH-Gruppe, die es der Polymerase ermöglicht die Synthese fortzufahren. Im Gegensatz dazu kann anstatt des dNTP auch das jeweilige ddNTP eingebaut werden, das bezüglich des Fehlens einer OH-Gruppe am 3`C-Atoms zu einem Abbruch der Synthese führt. Der Einbau der dNTPs bzw. der ddNTPs, welche sich in einem bestimmten Verhältnis zueinander in dem Reaktionsgemisch befinden, erfolgt nach den Gesetzen der Statistik, sodass DNA-Fragmente aller Längen entstehen, die bei jeweils einer Base enden. Die vier Reaktionen für 4 verschiedene Basen werden anschließend auf ein Gel aufgetragen und ausgelesen. Detektiert wurden die Abbruchprodukte bis in die späten 80er entweder mit Hilfe von radioaktiv markierten Primern oder ddNTPs, welche auf ein Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt wurden und die Sequenz durch Autoradiographie auf einen Röntgenfilm abgelesen werden konnte.

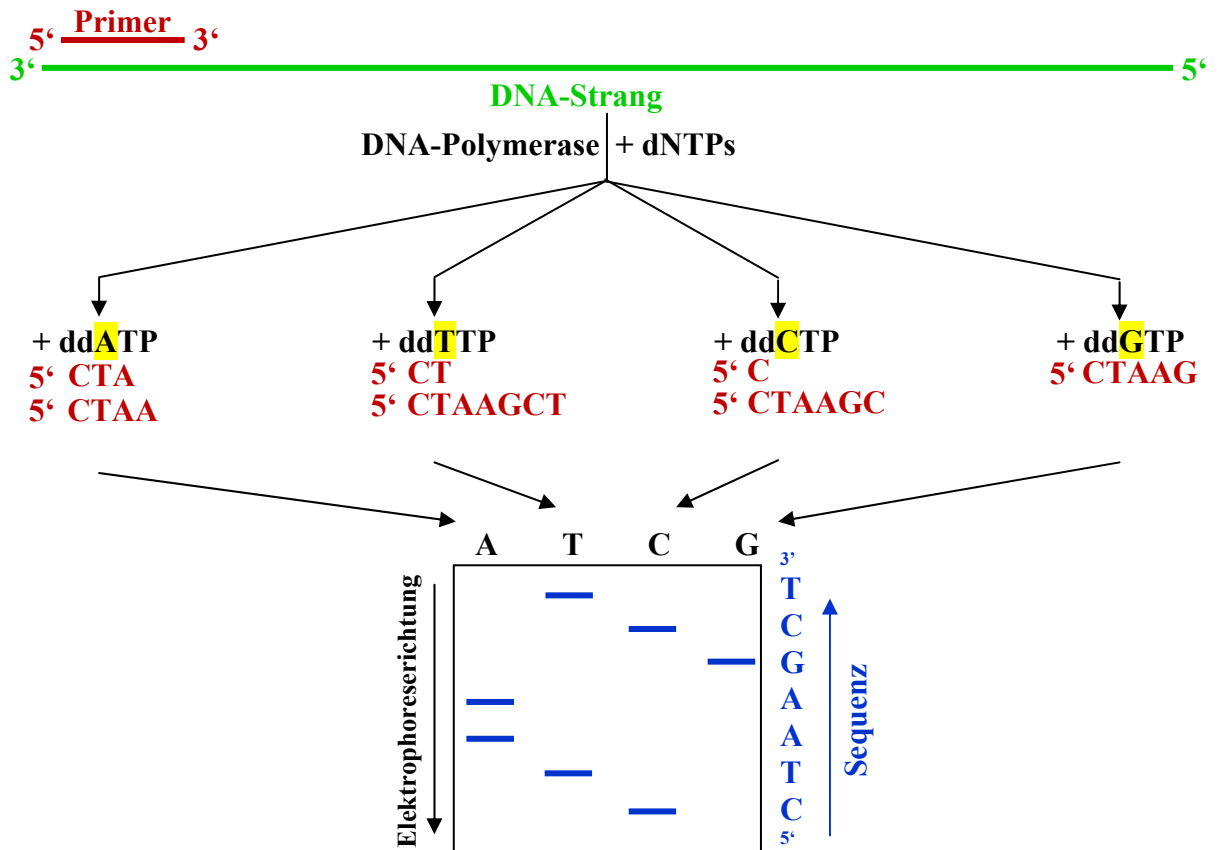


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der Dideoxy-Methode nach Sanger.

4.10.2 Cycle-Sequenzierung

Dank der Entwicklung der Cycle-Sequenzierung, das auf dem Verfahren der PCR (Mullis & Faloona 1987) basiert und der Entstehung neuer automatischer Detektionsgeräte (Ansorge et al. 1986), die sich nun anstatt radioaktiver Markierungen die Fluoreszenzfarbstoffe zu nutzen machten, konnte das Verfahren der Sequenzierung bis zum heutigen Tage enorm verbessert werden, sodass auch größere Mengen an Proben vollautomatisiert untersucht werden können.

Die Cycle-Sequenzierung ist eine Variation der PCR mit sich wiederholenden Phasen. Allerdings wird nur ein Primer eingesetzt, was eine lineare Amplifizierung der DNA zur Folge hat. Die hinzugefügten ddNTPs führen zum Einen zum Abbruch der Synthese

und zum Anderen dienen sie aufgrund der vier unterschiedlich fluoreszierenden Markierungen der Detektion der Sequenz. Dies hat den Vorteil, dass die Abbruchprodukte für alle 4 Basen in einer Reaktion detektiert werden können.

4.10.3 Kapillargelelektrophorese

Die Ermittlung der Sequenz geschieht mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese, bei der die Trennung der geladenen Teilchen in einer dünnen Glaskapillare in einer Elektrolytlösung stattfindet. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller durch das Gel hin zur Anode bis die Fluoreszenzfarbstoffe an einem nicht beschichteten Bereich der Kapillare von einem Laser angeregt werden. Daraufhin emittieren diese je nach Farbstoff Licht in einer bestimmten Wellenlänge, welche zugleich von einem Detektor erfasst und in digitale Signale verarbeitet wird. Computerprogramme, wie die GeneMapper© ID-Software, rechnen diese Daten um und ordnen jedem Signal die dazugehörige Base zu. Ein Beispiel einer so entstandenen Sequenz ist in Abbildung 4.7 zu sehen.

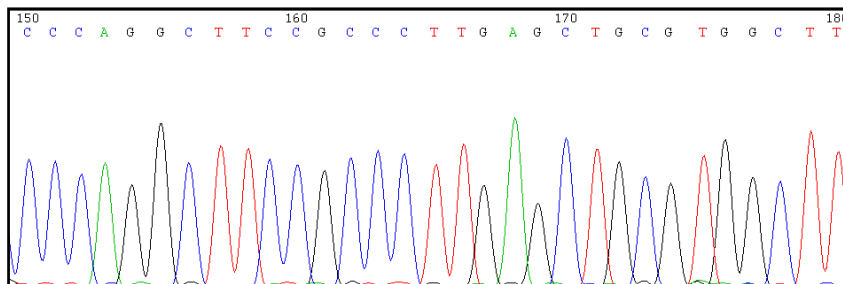


Abb. 4.7 Ausschnitt einer Sequenz, generiert mittels eines ABI PRISM 310;
Dargestellt sind:
C = blau, A = grün, G = schwarz, T = rot

4.10.4 Durchführung der Sequenzierung

4.10.4.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurde eine PCR mit der zu untersuchenden cDNA und beiden, den Zielbereich eingrenzenden, Primern durchgeführt. Die anschließende Reinigung des PCR-Produktes erfolgte nach Protokoll des QIAquick PCR Purification Kits. Hierzu

wurden 100µl des PB-Puffers mit einem Fünftel (20µl) des zu reinigenden PCR-Produktes für 1 min bei 13000 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend fügten wir 750µl des PE-Puffers hinzu und es erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 13000 upm für 1 Minute und nach Verwurf eine erneute Wiederholung. Die nun in einer siliziumhaltigen Membran in der Säule hängen gebliebenen und von überschüssigen Primern nicht gebundenen Nukleotide und die von restlichen Detergenzien befreite DNA, konnte mit Hilfe eines Elutionspuffers gelöst werden. Diesbezüglich wurden 30µl des Elutionspuffers auf 65C° vorgeheizt und für 1 Minute auf die Säule mit der gebundenen DNA gegeben, bevor diese dann bei 13000 upm für 1 Minute zentrifugiert und in einem Tube aufgefangen wurde.

Zur quantitativen Kontrolle des gereinigten PCR-Produktes lief eine kleine Menge von 5 µl über ein Minigel, um je nach Bandenstärke 1 µl bis höchstmöglich 13 µl des PCR-Produktes für die Sequenzierung einzusetzen.

4.10.4.2 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem BigDye^R Rhod. v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Die Konzentration des gereinigten Produktes variierte hierbei meist um die 1-2 µl und konnte in seltenen Fällen bei einer sehr geringen Bandenstärke auch bis zu 10 µl betragen, sodass sich folgender Ansatz ergab:

Ansatz	Menge
BD Cycle-Sequencing Mix	4 µl
5x Puffer	2,5 µl
Primer (3,2 pmol)	1 µl
PCR-Produkt	1-12,5 µl
HPLC-Wasser	Ad 20µl

Tab. 4.7 Ansatz einer Sequenzierung. Die Menge des eingesetzten PCR-Produktes variierte je nach Qualität.

Dieser Ansatz wurde nach Anleitung amplifiziert (zunächst 1min 96°C, dann 25 Zyklen 10 sec 96°C, 5 sec 50°C, 4 min 60°C), danach gereinigt und gefällt. Zu diesem Zweck wurden zunächst 80µl HPLC-H₂O (High pressure liquid chromatography) und 2,5µl

0,5M EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) mit 20µl des amplifizierten Produktes zusammen gefügt. Anschließend erfolgte die Herstellung eines Mixes aus 250µl ETOH (Ethanol) 100%, 1µl Blue Dextranlösung und 10µl 3M NaAcetat (ph 4,8), der zu dem in EDTA verdauten Produkt hinzugegeben, gevortext und bei RT für 10 min stehen gelassen wurde. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch bei 13000 upm für 25 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und 300µl ETOH 70% hinzugefügt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 upm und wiederum sorgfältiger Abnahme des Überstandes, trocknete der Inhalt bei 45-50 C° für 30-45 min. Abschließend wurde das vollständig getrocknete Pellet in 25 µl HiDi-Formamid aufgenommen und gelöst, und war damit fertig zur Sequenzanalyse durch die Kapillargelelektrophorese in dem ABI PRISM Genetic Analyzer.

4.11 Short Tandem Repeats - STR

Short Tandem Repeats sind sich wiederholende Sequenzen von 1 Basenpaar (bp) bis hin zu mehreren 1000 bp, welche in nicht kodierenden Bereichen der DNA vorkommen. Des Weiteren kann man diese DNA-Sequenzen anhand der Anzahl ihrer sich wiederholenden Basen in Mikrosatelliten (2-7 bp) und Minisatelliten (10-100 bp) unterteilen (Tautz 1993).

Seit ihrer Entdeckung (Jeffreys et al. 1985) werden sie besonders in der Forensik zur Unterscheidung und Identifikation von Individuen verwendet.

Durch eine in der Rechtsmedizin der Universität in Mainz etablierte Methode zur Untersuchung von degradiertem DNA (Bender et al. 2004) konnten auch sehr kleine DNA-Mengen aus Patientenproben im Hinblick auf den Chimärismus der Langerhanszellen bestimmt werden.

Zur Anwendung kam hierbei eine Bioplex aus 11 unterschiedlichen STR-Systemen, welche in eine 6-Plex aus dem ESS (European Standard Set of loci for DNA databases) mit den Lokalisationen D3S1358, D8S1179, D21S11, THO1 (humanes Tyrosin Hydroxylase-Gen), FGA (humanes alpha Fibrinogen-Gen) und VWA (humanes von Willebrandfaktor-Gen) sowie eine 5-Plex mit den Loci D2S1338, D5S818, D12S391, TPOX (humanes Thyroid Peroxidase-Gen) und dem geschlechtsspezifischen

Amelogenin, aufgeteilt worden ist. Für die Analyse wurden 10µl des Master Mixes sowie 5µl des Primer Sets des AmpF/STR®SEfiler PlusTM PCR Amplifikation Kits als Reaktions-Mix zusammen gefügt und mit 0,5-0,75ng DNA in 10µl TE-Puffer bei 3000 upm für 20 s zentrifugiert.

Die anschließende Amplifizierung der 11 Systeme in Multiplex-Ansätzen lief unter folgendem Programm ab:

Dauer	Temp.
15 min	96°C
30 sec	94°C
90 sec	57°C
90 sec	60°C
30 min	60°C

} 30 Zyklen

Tab. 4.8 PCR-Zyklen in Vorbereitung auf die Analyse mittels STR.

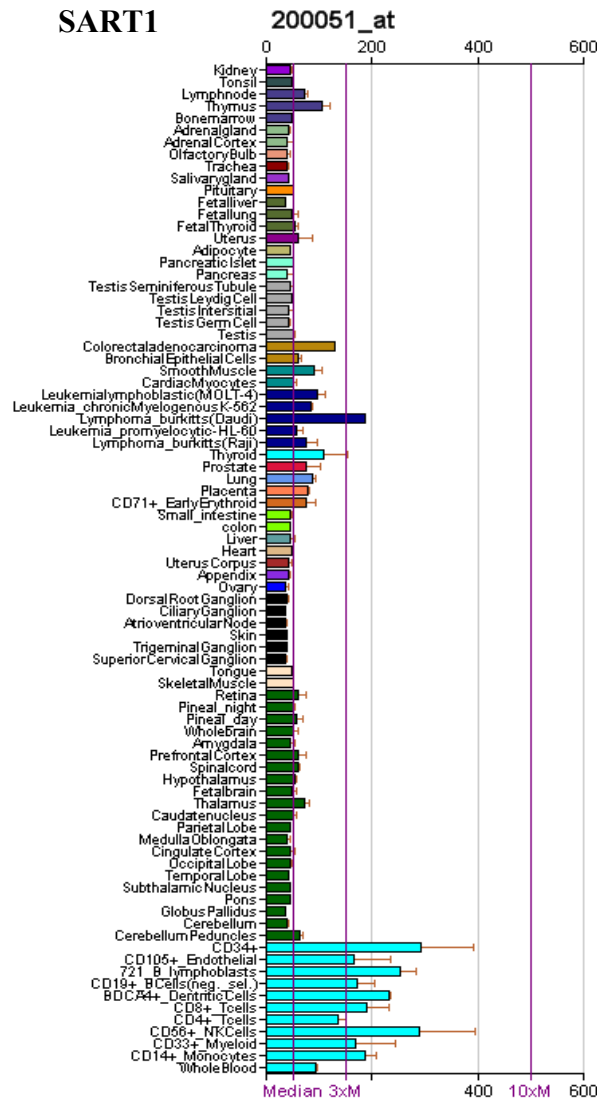
Des Weiteren wurden mit diesem Schritt unter Zuhilfenahme von Biotin-Markierungen an den Loki D5S818, FGA, THO1, TPOX und VWA, welche die Fixierung derer erleichtert, die zu untersuchenden Abschnitte sondiert. Die Multiplex-Produkte wurden anschließend unter Hinzugabe von Formamid und eines internen Längenstandards (ILS600) mittels der Kapillargelelektrophorese anhand fluoreszierender Farbstoffe an den Forward Primern detektiert.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung geeigneter SNPs

Mit dem Ziel, Geschwister mit Hilfe von einzelnen Polymorphismen auf Ebene der cDNA zu unterscheiden, begannen wir einen Pool von SNPs aufzubauen, welche die notwendigen Voraussetzungen für unsere Fragestellung erfüllen sollten. Als Basis dieser Untersuchung dienten uns Gene aus Publikationen (Liljedahl et al. 2004), deren SNPs und Primer teilweise bereits zuvor von unserer Arbeitsgruppe als proof-of-principle dieses Verfahrens etabliert wurden (Bakhtiar et al. 2010).

Weiterhin orientierten wir uns an einer Liste von konstitutiv exprimierten Genen (Eisenberg & Levanon 2003), welche 575 identifizierte Housekeeping Gene umfasste, die von allen Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase konstitutiv exprimiert werden. Jedes dieser insgesamt 674 Gene wurde mit Hilfe der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) auf das Vorhandensein von SNPs untersucht, die nachfolgende Merkmale aufweisen sollten. Neben der Begrenzung auf den Homo sapiens und auf kodierende Abschnitte der DNA, war für uns die Heterozygotenwahrscheinlichkeit, sprich die prozentuale Verteilung des jeweiligen Allels auf die europäische bzw. die globale Gesamtbevölkerung, von größtem Interesse. Je näher diese Verteilung an 50% herankommt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Unterscheidung der Allele der SNPs, insbesondere auch im Hinblick auf Geschwister. Zusätzlich begrenzten wir uns auf SNPs, deren Variationen sich auf zwei Basen limitierten. Aufgrund dieser Einschränkungen, welche durch uns unter „Limits“ in der Datenbank markiert wurden, entsprachen 404 der 674 Gene (59,94%) nicht unseren Anforderungen, weitere 54 (8%) stimmten in der dargelegten Definition nicht überein und wurden dementsprechend nicht weiter berücksichtigt. Bei näherer Betrachtung der Eigenschaften bzw. der Funktion der Gene wurden bei 37 Genen (5,49%) in der Datenbank des NCBI ein alternatives Splicing bzw. vorliegende Mutationen beschrieben, welche auf nachfolgende Untersuchungen des SNPs Einfluss hätte ausüben können.



Die konstitutive Expression der Gene wurde erneut unter Anwendung von SymAtlas (<http://biogps.gnf.org/?symatlas=/SymAtlas/symform%3f#goto=welcome>) vor allem auch in Bezug auf hämatopoetische Zellen betrachtet, wie hier am Beispiel des SART1 (squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells) in Abb. 5.1.

Abb. 5.1 Darstellung der Expression des SART1-Gens in unterschiedlichen Geweben mit besonderem Augenmerk auf Hämatopoetische Zellen, hier hellblau im unteren Abschnitt veranschaulicht. (<http://biogps.gnf.org/?symatlas=/SymAtlas/symform%3f#goto=genereport&id=9092>)

5.2 Ausschluss von Kontaminationen genomischer DNA

Da wir SNPs nur auf Ebene der cDNA untersuchten, wurden die Primer für die Amplifikation der SNP-kodierenden Region so gewählt, dass sie mindestens ein Intron, d.h. ein Abschnitt nicht-kodierender DNA im Genom, umfassten. Diesbezüglich nutzten wir die Funktion des Sequenz Viewers der NCBI eines jeden Gens, um den SNP auf der Sequenz genau zu lokalisieren und Entfernungen zu Intron/Exon-Grenzen bestimmen zu können. Hierbei zeigte sich, dass 54 SNPs auf 51 Genen zu weit am Ende bzw. Anfang eines Gens lagen, sodass keine Primer vor/nach dem Polymorphismus

erstellt werden konnten. Die Einschränkung der PCR-Produktlänge auf 100 bis 500 bp führte zu einer weiteren Reduktion möglicher SNPs um 68, verteilt auf 49 Genen, meist aufgrund fehlender Introns oder zu langer Exonabschnitte, die bei Einhaltung der Intron/Exon-Grenze die vordefinierte Basenzahl weit überschritten hätte. Der Vorteil dieser Vorgehensweise allerdings ermöglicht eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA gleich anhand der Basenlänge nach PCR im Gel zu erkennen (s. Abb. 5.2).

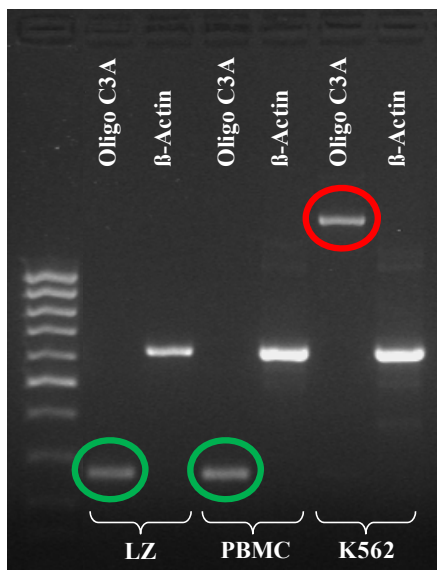


Abb. 5.2 Kontamination mit genomischer DNA: Oligo-Primer hier getestet an LZ und PBMCs, welche beide nicht kontaminiert sind (grün umrandet) und an K562-Zellen, die eine genomische Bande aufweisen (rot umrandet).

5.3 Primer- und Sondendesign

Im nächsten Schritt wurden die Primer zur Amplifikation der SNP-kodierenden cDNA generiert. Hierfür wurde die Software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) verwendet, in welche die Originalsequenz des Genes (NCBI), welche über eine Intron/Exon-Grenze hinaus und um den SNP herum markiert, eingesetzt wurde. Die meist 3-4 verschiedenen Optionen der Primerpaarbildung wurden auf potentielle Interaktionen mit bereits ausgewählten Primern anderer Gene im Hinblick auf einen Multiplex-PCR Ansatz mittels des Programms FastPCR analysiert. Bei mehr als sieben registrierten Ereignissen wurden erneut mögliche, von Primer 3 analysierte, Primerpaare gegeneinander getestet (s. Abb. 5.3)

```

FastPCR
result - Editor
Datei Bearbeiten Format Ansicht ?

Test for Primer:
>bsg r
5'-aatctacgggggtgggttttc

Dimer with primer:
>entpd6-2076561 f
5'-cacgttaaccacgaaacct

5-aatctacgggggtgggttttc->
      ||||| |
      <-tccaaagcacccaattgcac-5

Dimer with primer:
>lasp1 f
5'-gaagaccaggaccagatca

5-aatctacgggggtgggttttc->
      | ||||| |||
      <-actagaccaggaccagaag-5

```

Abb. 5.3 Darstellung der Interaktionen mit dem Bsp. Des Reversen Primers des BSG-Gens (*bsg r*) jeweils mit den Forward Primern des ENTPD6-Gens mit 7 Interaktionen und dem Forward Primer des LASP1-Gens mit 9 Ereignissen.

Mit Hilfe der Software Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) konnten nun die zur SNP-Analyse benötigten Mini-Sequenzierungs-Sonden ausgewählt werden. Hierfür wurden die, an den SNP angrenzenden Sequenzen und deren komplementärer Strang, eingefügt und die Länge der Sonden so gewählt, dass ihre vorhergesagte Schmelztemperatur bei 60°C (+/-1°C) lag, ohne Berücksichtigung der zur Längendifferenzierung später hinzugefügten Poly-T-Schwänze.

Zudem half die Software die Bildung von sog. Loops oder Hairpins (Sondeninterne Bindung der DNA) zu erkennen und somit potentielle Interaktionen innerhalb der Sonde zu vermeiden. Bei 19 der SNPs fanden sich sowohl auf dem Forward-, als auch auf dem Revers-Strang keine Möglichkeit eine Mini-Sequenzierungs-Sonde zu generieren.

5.4 Expressivität der ausgewählten Gene

Das weitere Vorgehen galt der Testung der Primer der selektierten Gene auf ihre Expression in unterschiedlichen Geweben, wobei hierbei unser Augenmerk auf Zellen hämatopoetischer Genese lag - CD4, CD8, CD15, CD19, K562 und LZ. Ebenfalls getestet wurden KZ und zum Teil auch DZ zur Abgrenzung einer Kontamination im

Bezug auf LZ. Abbildung 5.4 zeigt als Beispiel die ersten 4, wie oben beschrieben, ausgewählten SNPs mit Prüfung der Expression auf LZ.

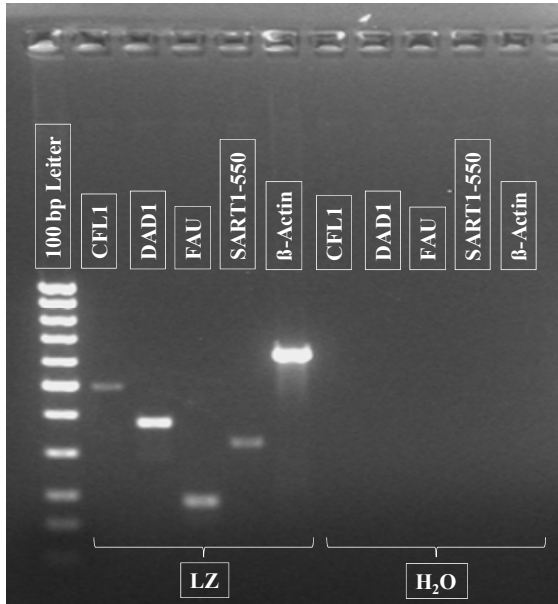


Abb. 5.4 Expression der SNPs: CFL1, DAD1, FAU und SART1-550 auf LZ. Als positiv-Kontrolle dient das β -Actin, als negativ-Kontrolle die Primer in Verbindung mit H₂O.

Die Testung der Expression aller ausgesuchten 67 Primerpaare und den damit assoziierten Genen ist in Tabelle 5.1 angegeben.

Primer	Gewebe	PBMC	KZ	LZ	CD 4	CD 8	CD 15	CD 19	K562	DZ
ACTB-107		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
ADAM15-303		xxx	xxx	o	xxx	x	o	/	xxx	/
AP1B1-765		xxx	xxx	xxx	x	o	/	o	xxx	/
AP1B1-051		xxx	xxx	xxx	xxx	x	o	/	xxx	/
ATP6V1G1-842		xx	o	o	xxx	x	x	/	xxx	/
BAT1-527		o	/	/	/	/	/	/	/	/
BSG-637		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
BTBD2-045		xxx	xxx	x	xx	xxx	/	xxx	xxx	/
BTBD2-352+820		xxx	xxx	x	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
C2orf24-160+102		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
CCBP2-468		xxx	o	o	o	x	x	/	xxx	/
CD23 FCER2-138		xxx	o	o	xxx	x	/	xx	o	/
CFL1-3201150		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
CGB7-085+417+456		o	x	o	o	o	/	o	xxx	/
CHD4-1639122		xxx	xxx	xxx	x	o	/	o	xxx	/
CKB-505+283		xxx	xxx	xxx	xxx	xx	/	o	xxx	/
CTSD-214		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	/
DAD1-621		xxx	/	xxx	xxx	xxx	o	xxx	/	/
DDOST-704		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
DULLARD-206		x	/	/	/	/	/	/	/	/

Primer	Gewebe	PBMC	KZ	LZ	CD 4	CD 8	CD 15	CD 19	K562	DZ
ENTPD6-559		o	o	o	o	o	/	o	o	/
ENTPD-561		xxx	xxx	o	xxx	xxx	/	o	xxx	/
FAU-055		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
FLNB-640		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	x	xxx	xxx	xxx
GAPDH-691		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	/
GNAS-121		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
GOT2-636		xxx	xxx	xx	xx	xxx	/	xxx	xxx	/
GOT2-842		xxx	xxx	xx	xx	xxx	/	/	xxx	/
HLA-C-281+317+326		xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	/
HSP90AB1-296		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
ID3-096		xxx	xx	xx	x	x	/	xxx	xxx	/
JAM3-320		xxx	xx	o	xx	x	/	xxx	xxx	/
KIFC3-172		xxx	xxx	x	o	x	/	o	xxx	/
LASP1-989		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	o	xxx	/
LDLR-925		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	o	o	xxx	xxx
LDLR-930		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	x	x	xxx	xxx
MAP2K2-250		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
MCM3AP-173		xxx	x	xx	xxx	xxx	/	xx	xxx	/
MCM3AP-181		xxx	x	xx	xxx	xxx	/	xx	xxx	/
MCM3AP-450		xxx	x	xx	x	xxx	/	xx	xxx	/
MGC2749-648		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
MRPL9-480		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
MTX1-077		o	o	o	o	o	/	o	o	/
NFKBIA-696+904		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
PGD-567		xxx	xxx	xxx	x	x	/	o	xxx	/
POLR2L-591		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
PTOV1-996		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	o	xxx	/
PTTG1IP-314		xxx	xxx	xxx	x	o	/	o	xxx	/
RPN1-697		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	o	xxx	/
RUVBL2-708		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	o	xxx	/
SART1-435		xxx	/	xx	xxx	xxx	o	xxx	/	/
SART1-118		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
SART1-862		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
SLC6A7-793+794		o	o	o	o	o	/	o	o	/
SOD2-301		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx
SREBF1-017		xxx	xxx	x	o	o	/	o	xx	/
SRP14-208+521		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
STK19-634		xxx	o	x	xxx	xxx	/	x	xxx	/
TACCI-204		xxx	o	xx	xxx	xxx	/	xx	xxx	/
TACCI-586		xxx	o	xx	xx	xxx	/	xx	xxx	/
TAPBP-888		xxx	xxx	xxx	xxx	x	x	/	xxx	/
TCEB2-855		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
TFRC-672		xxx	xxx	xxx	xx	xx	/	xxx	xxx	/
TRAP1-926		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	/	xxx	xxx	/
TSTA3-832		xxx	xxx	x	x	x	/	o	xxx	/
USP22-037		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/
USP9Y-496		xxx	/	/	/	/	/	/	/	/

Tab. 5.1 Zur kurzen Erläuterung: **xxx** = normale Bande; **xxx** = Doppelbanden; **xx/xx** = schwache Bande(n); **x/x** = sehr schwache Bande(n); **o** = keine Bande; **/** = keine Messung durchgeführt. Gelbe Markierung = Expressionsschwierigkeiten, orangene Markierung = Probleme bei der Mini-Sequenzierung/Sequenzierung oder keine Minisequenzierungs-Sonde generierbar. Grün markiert noch potentiell weitere SNPs zur Testung.

Zunächst wurden die Primer der Gene an PBMCs, anschließend auch an hämatopoetischen Zellen analysiert. Hier zeigten sich bei 22 Genen Schwierigkeiten in der Expression, im Sinne von Doppelbanden oder sehr geringer Expressivität, welche auch nach wiederholten Testungen auftraten. Aufgrund dessen erfolgte bei diesen Primern auch keine weitere Analyse an anderen Populationen (in Tab. 5.1 gelb markiert). Bei in der Tabelle orange markierten SNPs kam es unter der Mini-Sequenzierung oder Sequenzierung (s. 5.6) zu Komplikationen.

5.5 Multiplex-PCR

Abhängig von vorhergesagten Interaktionen erfolgte die Einteilung der Primer zur Zusammensetzung einer Multiplex-PCR in Gruppen. Zum einfachen Nachweis der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese, kombinierten wir die Multiplex-Ansätze möglichst so, dass die einzelnen Produkte aufgrund der unterschiedlichen Basenlänge gut zu erkennen waren. In diesem Zusammenhang wurden zugleich die Mini-Sequenzierungs-Sonden der Multiplex-Ansätze auf Interaktionen untereinander analysiert sowie die Länge der Sonden aufeinander abgestimmt zur späteren Überführung der Multiplex-PCR in Multiplexansätze der Mini-Sequenzierung.

Dazu wurden letztendlich im Durchschnitt drei bis sechs Primerpaare zu einer Multiplex-PCR zusammen gestellt. Ein Beispiel einer Multiplex-PCR ist in Abbildung 5.5 und 5.6 gezeigt, die aus den nebenstehenden Primern des CFL1-rs3201150, DAD1-rs7621, FAU-rs14055, SART1-rs550435 und des LDLR-rs5925 besteht.

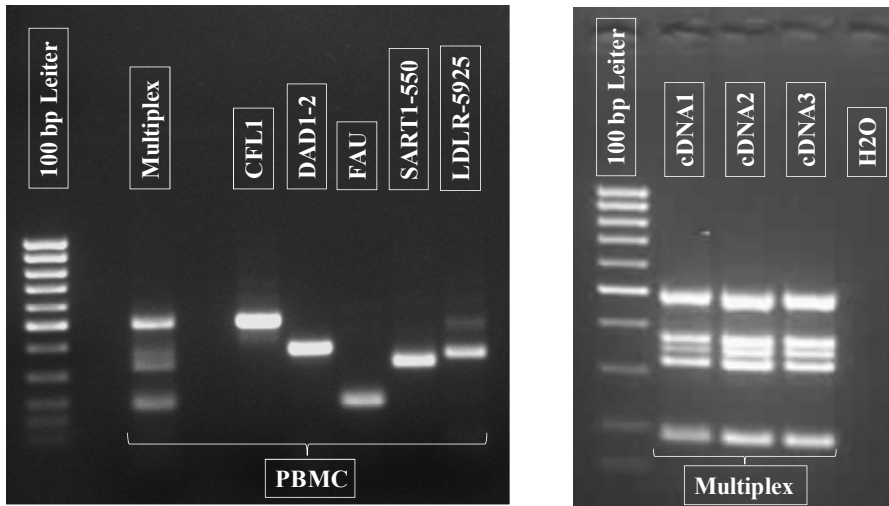


Abb. 5.5 und 5.6 Ganz links zu sehen in einer Multiplex von oben nach unten: CFL1-rs3201150-495bp, DAD1-rs7621-382bp, LDLR-rs5925-351bp, SART1-rs550435-323bp, FAU-rs14055-190bp. Daneben werden die PCR-Produkte des konventionellen Ansatzes noch einmal einzeln dargestellt. Rechts erneute Darstellung der Fünf-plex mit cDNA dreier Patienten und einer negativ-Kontrolle mit Wasser in einem höher prozentigem Gel (2,5%), in dem man die Banden noch deutlicher voneinander trennen kann.

Zur Optimierung wurden die nach allen Selektionsverfahren verbliebenen 30 Primerpaare zu sechs Multiplexansätzen zusammen gefasst, um die Handhabung der anschließenden Mini-Sequenzierung zu vereinfachen.

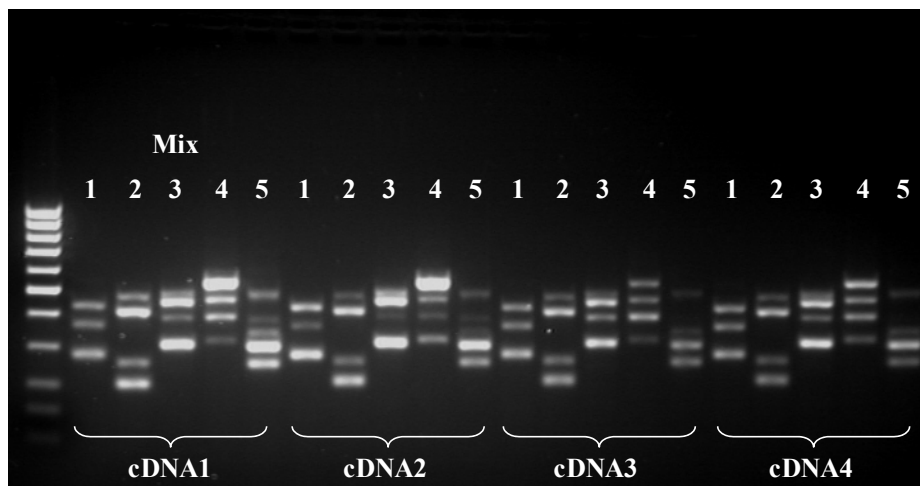


Abb. 5.7 Hier zu sehen 5 der 6 Kombinationen in einer Multiplex-PCR mit PBMCs von 4 verschiedenen Patienten. Durch die deutliche Veranschaulichung der PCR-Produkte lässt sich der Erfolg der Amplifizierung direkt nachweisen.

5.6 Mini-Sequenzierung

Die Analyse der SNPs erfolgte nun mit Hilfe der bereits designten Mini-Sequenzierungs-Sonden. Die Funktionalität der Mini-Sequenzierung war an PBMCs gesunder Probanden getestet worden, ehe sie in Multiplexvarianten für die Chimärismusanalysen der Patienten benutzt wurden.

Für jeden SNP wurde eine Mini-Sequenzierungs-Sonde eingesetzt, deren Länge sich von den anderen um mindestens vier Basen unterschied. Dies wurde durch die oligo-dT-Schwänze erreicht und erleichterte die Identifikation des individuellen SNPs in der Kapillarelektrophorese, so dass die Multiplex-PCR in einem Multiplex-Ansatz der Mini-Sequenzierung überführt werden konnte. Die Referenzsonde (LIZ 120), die in jedem Lauf als interner Standard dient, umfasste dabei eine Länge von 120 Basen, sodass die untersuchten Gensonden zwischen 18 und 116 Basen lang sein konnten. Sonden gleicher Länge mussten in einem separaten Ansatz getrennt analysiert werden. In Tab. 5.2 sind alle Mini-Sequenzierungs-Sonden dargestellt, die sich für die weitere Testung qualifizierten.

Gen	rs-Nummer	Länge	Mini-Sequenzierungs-Sonde	SNP
SOD2	2301	18	GCA GGC AGC TGG CTC CGG	C/T
SART1	550435	22	TTT TGC TGC GGG AGA AGC TGG C	G/A
RUVBL2	1062708	22	GGC GAC GGG CAA GAT CTC CAA G	C/T
GNAS	8049/7121	26	AAG TCA GGC ACG TTC ATC ACA CTC AG	G/A
CKB	1803283	26	TTT TTT TT GCC CTG CTC CAG CCG CTG	C/T
LDLR	5930	30	TTT TTT TTT T CCG TCG GGG GCC TGG ATG TC	C/T
TACC1	2037204	30	GGA TGA AAA CGC ATG ATT TAT GGT AGA CAC	G/A
SRP14	16924521	34	TTT TTT TTT TT TGC TGC TGT TGC TGT TGC TGC TG	C/T
LASPI	525989	34	TTT TTT TTT TTT T GGA GCC AGA GCG TCG GGA TTC	G/A
FLNB	8640	39	TTT TTT TTT T CCC ATG GCT CCT GGT AAC TAC CTG AT CAG	C/T
PTOV1	10996	40	TTTT TTT TTT TTT TTT TTT CAG GGT GGT CAG CAG CTG CTG	A/C
BTBD2	2286352	40	TTT TTT TTT TTT TTT TTT T GGC CAT CAT CTG CTG CTG GGG	C/T
MCM3AP	2839181	44	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT ATT GCC CCC CGT CCC TCG TCA	C/T
MCM3AP	2839173	44	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T TGA GCC GCC TTA ACC TGG TGC A	G/A
LDLR	5925	48	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCT ACT GTC CCC AGA GGA TAT GGT	C/T
DAD1	7621	52	TTT T TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAC CTT GTT GTC ATG AAC TTT GTT GGC TGA	A/C

Gen	rs- Nummer	Länge	Mini-Sequenzierungs-Sonde	SNP
CKB	12505	52	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTG GTG GAC GGA GTG AAG CTG	C/T
SART1	660118	56	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGGA GCT CCA CCG CCG G	C/G
STK19	616634	56	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTA CTT TGC CTT CCG GAC CAT GC	C/T
AP1B1	174765	60	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCC CCT CCA GGT CCA CGC	G/A
RPN1	1697	64	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CAG TCT ACA CCC ATG TGC TTC ATC C	G/A
MCM3AP	11702450	68	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GAA GTC ACA GCC ATC CAG TGC AAG AA	C/T
NFKBIA	8904	72	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AAG TCC ATG TTC TTT CAG CCC CTT TGC	G/A
BTBD2	7254820	72	T TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT GAC ACC GCC CTC CCT CCG	C/T
TCEB2	1058855	76	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT ACC ATG GGG ACC TGG GTT GCC CT	C/G
NFKBIA	696	76	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTA CTT ATA TCC ACA CTG CAC ACT GCC T	G/A
CTSD	12214	80	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T TGT GTG TGG GAG GGG CCG C	C/T
BTBD2	1610045	80	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T TGC CCG ACG TGG AAC CCG C	C/T
USP9Y	7067496	84	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGCC CCA CCA CAG CAT GAA GAT GAA GA	G/T
BSG	8637	84	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT CGA GGA CGC TCC CTG CTC C	G/A
SRP14	8208	88	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT CAA ACC TCC TTA GAG CTA ACA TGG ATG GG	C/T
CHD4	1639122	88	TTT GGA AGG AGG AGG AGG AGG AGG A	G/T
PGD	11121567	92	TTT T GCA GCA GGT GTT TGC CAT CCG T	G/A
MAP2K2	10250	92	TTT GGG GTG AGC GGC CAG CTC AT	A/C
PTTG1IP	235314	96	TTT TT CGA CGC TTC CTG TGA GGT GCA C	G/A
POL2RL2	6591	96	TTT AGC ACA GCG GGT GGG TGG GTT	C/T
ID3	1050096	100	TTT TT CCC ACC CCC AAG TTC TAA GGT CT	C/T
MRLP9	8480	100	TTT GCC CCA CCG TGT GAT AGG CTC T	G/T

Gen	rs-Nummer	Länge	Mini-Sequenzierungs-Sonde	SNP
AP1B1	2072051	104	TTT TT GGA CAA CCT GGA GCT GAA GAA GCT	G/A
GOT2	30842	104	TTT TTATG CCA ATG ATG CGG TCA GCC ATG	A/C
TRAP1	13926	108	TTT TGG ATG ATG GAC CCC AAG GAT GTC	C/G
TACC1	2013586	108	TTT CAA GCC AGA TCC TAG TCA GTG GGA	G/A
GOT2	257636	112	TTT GAG TTG GTG CCT ACC GGG ATG ATA A	C/T
TFRC	3817672	112	TTT TT AGA AAC TGG ACA GCA CAG ACT TCA CC	G/A
DDOST	4704	116	TTT GAG ACC ATC AGT GCC TTT ATT GAC GG	C/T

Tab. 5.2 Darstellung der Mini-Sequenzierungs-Sonden mit Angaben über das Gen und dessen rs-Nummer, sowie die Länge der Sonden mit dem dazugehörigen SNP. Darunter die blau markierten Sonden, die nach weiteren Verfahren aussortiert wurden.

Ursachen, die zu einer Reduzierung der anfangs 45 Mini-Sequenzierungs-Sonden hin zu einer Anzahl von 30 Sonden führten, ergaben sich angefangen von funktionellen Problemen, über unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich der Methoden der Mini-Sequenzierung und der zur Kontrolle durchgeführten Sequenzierung, bis hin zur fehlenden Differenzierung der Geschwister.

Unabhängig davon existieren noch weitere 8 SNPs, bei denen noch Möglichkeiten des Designs von Primern und Mini-Sequenzierungs-Sonden sind und als Reserve-SNPs bereit liegen.

Im Anschluss ist noch einmal eine schematische Übersicht der Identifizierung geeigneter SNPs dargestellt, angefangen vom SNP-Pool bis hin zu den endgültigen 30 SNP-Systemen.

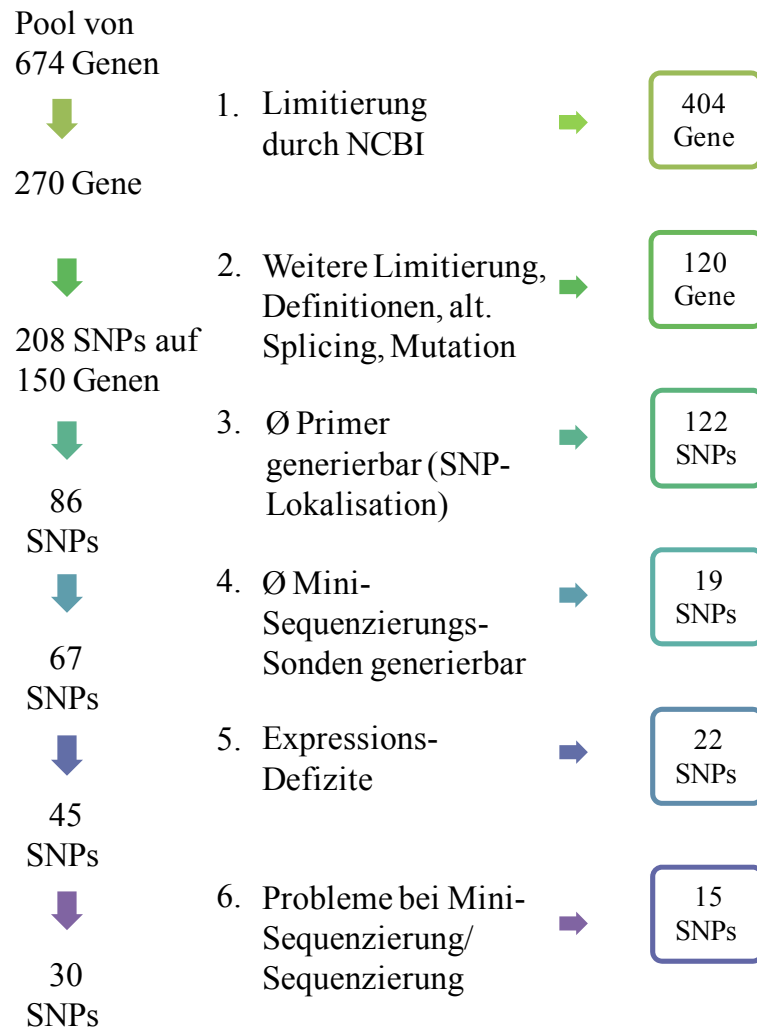


Abb. 5.8 Schematische Darstellung nach der Suche optimaler SNPs. Zu Beginn umfasste die Liste 674 Gene, die nach oben erwähnter Limitierung mittels NCBI eine Anzahl von 208 SNPs auf 150 Genen ergaben. Im Anschluss sind die einzelnen Qualitätsmerkmale dargestellt, die zum Ausschluss weiterer SNPs führten (□), bis nach vollständiger Testung 30 SNPs zum Screening der Patienten fest standen.

5.7 Unterscheidung HLA-identischer Geschwister

Nach erfolgreicher Testung der Sonden in einzelnen sowie in Multiplex-Ansätzen, konnten diese dann an Patientenmaterial zur Analyse der SNPs angewandt werden. Mit Hilfe dieser Multiplex-Ansätze untersuchten wir 24 Paare HLA-identischer Geschwister in der Mini-Sequenzierung mit dem Ziel, diese anhand der Allelverteilung voneinander differenzieren zu können. Ausgewählt wurden Geschwisterpaare, die im Rahmen einer Familienspendersuche identifiziert worden waren, unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Elf der Paare wiesen ein unterschiedliches Geschlecht auf, wohingegen die restlichen 13 Geschwister gleichgeschlechtlich waren. Die zur SNP-Analyse verwendete cDNA der Spender als auch der Empfänger wurde aus PBMCs extrahiert, welche zum Zeitpunkt vor Transplantation aus Blutproben gewonnen worden waren.

Unter Zuhilfenahme der Multiplex-Gruppen gelang es nun alle der 24 Geschwisterpaare in mindestens 6 bis hin zu 18 der 30 SNP-Systeme zu unterscheiden. Tabelle 5.3 zeigt diese 30 SNP-Systeme und deren jeweilige Wahrscheinlichkeit die 24 Paare untereinander zu differenzieren. Die erfolgreich getesteten Gene sowie deren Primer sind mit weiteren Angaben im Anhang in Tabelle 9.1 zur genauen Veranschaulichung noch einmal dargestellt.

Gen	rs-Nummer	Unterscheidung	in %	Differenzen der mHAGs
AP1B1	174765	6 aus 24	25	0
AP1B1	2072051	6 aus 24	25	0
BSG	8637	8 aus 24	33,3	0
BTBD2	1610045	8 aus 24	33,3	0
CKB	12505	0 aus 12	0	0
CKB	1803283	5 aus 12	41,7	0
DAD1	7621	8 aus 24	33,3	0
DDOST	4704	8 aus 24	33,3	0
GOT2	257636	16 aus 24	66,7	0
GOT2	30842	14 aus 24	58,3	8
ID3	1050096	5 aus 24	20,8	0
LASP1	525989	10 aus 24	41,7	0
LDLR	5925	10 aus 24	41,7	0

Gen	rs- Nummer	Unterscheidung	in %	Differenzen der mHAgs
MCM3AP	2839173	8 aus 24	33,3	0
MCM3AP	2839181	9 aus 24	37,5	0
MCM3AP	11702450	6 aus 24	25	0
MRPL9	8480	10 aus 24	41,7	2
NFKBIA	696	10 aus 24	41,7	0
NFKBIA	8904	10 aus 24	41,7	0
PGD	11121567	6 aus 24	25	0
POLR2L	6591	12 aus 24	50	0
PTOV1	10996	2 aus 24	8,3	0
PTTG1IP	235314	6 aus 24	25	0
RPN1	1697	8 aus 24	33,3	0
SART1	550435	10 aus 24	41,7	0
SART1	660118	9 aus 24	37,5	4
SRP14	8208	2 aus 24	8,3	1
TACC1	2013586	12 aus 24	50	0
TCEB2	1058855	9 aus 24	37,5	0
TFRC	3817672	9 aus 24	37,5	5

Tab. 5.3 Dargestellt die 30 SNP-Systeme, angegeben mit Gen, rs-Nummer, prozentualer Angabe der Differenzierung der Geschwister. Zusätzlich die Anzahl der vorkommenden Missens Mutationen, die zu Minor-Histokompatibilitätsantigenen (mHAgs) führen.

Zusätzlich wurden alle SNPs zum Einen unabhängig von den Ergebnissen der Mini-Sequenzierung auf cDNA aller drei möglichen Konstellationen (z.B. DAD1; Homozygot A, Homozygot C und Heterozygot A/C) sowie bei jeder nicht eindeutigen Analyse im Bereich der Mini-Sequenzierung zur Kontrolle einer Sequenzierung unterzogen. Die Ergebnisse beider Verfahren wurden dann auf Unstimmigkeiten hin miteinander verglichen, auch um eine Aussage über die Präzision der Mini-Sequenzierung bei unseren Untersuchungen treffen zu können.

In der nachfolgenden Tabelle (5.4) werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Geschwisterpaare anhand der 30 SNPs durch die Mini-Sequenzierung aufgeführt.

Sonde	Paar	AP1B1-765	AP1B1-051	BSC-637	BTBD2-045	CKB-505	CKB-283	DADI-621	DDOST-704	GOT2-636	GOT2-842	ID3-096	LASP1-989	LDLR-925	MCM3AP-173	MCM3AP-181	MCM3AP-450	MIRPL9-480	NEKBIA-696	NEKBIA-904	PGD-567	POLR2L-591	PTOV1-996	PTTG1IP-314	RPNI-697	SART1-435	SART1-118	SRP14-208	TACCI-586	TCEB2-855	TFRC-672	
SNP		G/A	G/A	G/A	C/T	C/T	C/T	A/C	C/T	C/T	A/C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G/A	C/T	A/C	G/A	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C/G	G/A
E1 (m)		A	G	A	T	C	T	A	C/T	C/T	C	C	G/A	C/T	G	T	T	T	G	G	G/A	T	C/A	A	G/A	G/A	C/G	T	G/A	C	A	
S1 (f)		A	G	A	T	C	T	A	C/T	T	A	C	G/A	T	G	T	T	T	G	G	G/A	C	C/A	A	A	G	G	T	G/A	C	G/A	
S2 (m)		G	G/A	G/A	T	C	C/T	A	T	C/T	C/A	C/T	G	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G	G	G	C/T	C/A	A	G	G/A	C/G	T	G	C/G	G/A	
E2 (f)		G	G/A	A	T	C	C/T	A/C	T	C/T	C/A	C/T	G/A	T	G/A	C/T	C/T	G/T	G	G	G	T	C/A	A	G	G	G	T	G/A	C	G/A	
E3 (m)		G/A	G/A	G/A	C	C	T	A	C/T	C	C	T	G	T	G/A	C/T	C/T	G	G/A	G/A	A	T	A	G/A	A	G/A	C/G	T	G/A	C/G	G/A	
S3a (m)		G	G/A-A	G/A	C	C	T	A	C/T	C/T	A/C	C/T	G/A	T	G/A	C/T	C/T	G	G	G	G/A	T	A/C	G/A	A	A	C	T	G/A	C/G	G	
S3b (m)		G/A	G/A	G/A	C/T	C	T	A	C	C	C	T	G	C/T	G/A	C/T	C/T	G	G	G	A	T	A-A/C	G/A	A	A	C	T	G/A	C/G	G/A	
E4 (f)		G/A	G	G/A	C/T	C	C/T	A	C/T	C	C	T	G	T/C	A	C	C/T	T	G/A	G/A	G/A	C/T	C/A	G/A	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C	A
S4 (f)		G	G/A-A	A	T	C	T	A	C/T	C	C	T	G	T/C	G/A	C/T	C/T	T	G/A	G/A	G/A	T	C/A	G/A	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C/G	G/A
E5 (f)		G	G/A	G/A	T	C	T	C	C/T	C	C	C	G	T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G/A	T	A	G/A	G	A	C	T	A	G	G	
S5 (f)		G	G/A	G/A	T	C	T	C	C	C/T	A/C	C	G/A	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G	G	G/A	T	A	G/A	G/A	G/A	C/G	T	A	C/G	A	
S6 (m)		A	G	G	C/T	C	C	A	T	C/T	C/A	C	G	C	G/A	C/T	C/T	G/T	G	G	G/A	T	A/C	A	A	G/A	C/G	T	G/A	G	G/A	
E6 (m)		A	G	G/A	C/T	C	C/T	A	T	T	C/A	C	G	C	G	T	C/T	G/T	G	G	G	T	A/C	A	A	G	G	T	A	G	G/A	
S7 (f)		G/A	G/A	A	T	C	T	A	C/T	C	C	C	G	T	G/A	C/T	C	T	G/A	G/A	G	T	A	G/A	G	G	G	C/T	A	G	G/A	
E7 (m)		G/A	G/A	A	T	C	T	A	T	T	A	T	G	T	G	C/T	C/T	T	G/A	G/A	G/A	C/T	A	G/A	G	G	G	C/T	A	G	A	

Sonde	AP1B1-765	AP1B1-051	BSG-637	BTBD2-045	CKB-505	CKB-283	DADI-621	DDOST-704	GOT2-636	GOT2-842	ID3-096	LASP1-989	LDLR-925	MCM3AP-173	MCM3AP-181	MCM3AP-450	MIRPL9-480	NFKBIA-696	NFKBIA-904	PGD-567	POLR2L-591	PTOV1-996	PTTG1IP-314	RPN1-697	SART1-435	SART1-118	SRP14-208	TACCI-586	TCEB2-855	TFRC-672
Paar	SNP	G/A	G/A	G/A	C/T	C/T	A/C	C/T	C/T	A/C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G/A	C/T	A/C	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C/G	G/A
S8 (m)	G/A	G/A	G	C/T	C	C/T	A	C	T	A	C/T-T	G/A	C	G/A	C/T	C	G/T	G	G	G/A	T	A/C-A	A	G/A	G	G	C/T-C	A	C/G	A
E8 (m)	A	G	G	C/T	C	T	A/C	C/T	C	C	T	A	C/T	G/A	C/T	C	G/T	G/A	G/A	G/A	C/T	A	A	G	A	C	C	G/A-A	C/G	A
S9 (m)	A	G	G/A	C/T	C	C/T	A	C	C/T	A	C/T	G/A	C	G/A	C/T	C/T	T	A	A	G	T	A	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C	A
E9 (m)	A	G	A	T	C	T	A/C	C/T	T	A	C/T	G/A	C	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G	T	A	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	A	C/G	G/A
E10 (f)	G/A	G/A	A	C	C	C/T	A	C	C	C	T	G	C/T	A	C/T	C/T	G/T	G	G	G	C/T	A	G/A	A	G	G	C	G/A	C/G	G/A
S10 (f)	G/A	G/A	A	C	C	C/T	A/C	T	C	C	T	G	C/T	A	C/T	C/T	G/T	G	G	G	T	A	G/A	A	G	G	C/T	A	C/G	G/A
E11 (f)	G/A	G/A	G/A	T	C	T	C	C	C	C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	C/T	T	G/A	G/A	G/A	C/T	A	G	A	G	G	T	G/A	C	G/A
S11 (m)	G/A	G/A	G	T	C	T	C	C/T	C/T	A/C	C/T	G	T-C/T	G	T	C/T	G/T	G/A	G/A	G/A	T	A	G/A	G	G	G	T	G/A	C	G/A
S12 (f)	G/A	G/A	G/A	T	C	C/T	A/C	T	C	C	C	G/A	C	G/A	C/T	C/T	G	G	G	G	T	A	G/A	A	G/A	C/G	T	G	C/G	G/A
E12 (f)	G/A	G/A	G/A	T	C	C	A/C	T	C	C	C	G/A	C/T	G	T	C/T	G	G	G	G	T	A	G	G/A	G	G	T	G/A	C/G	G
S13 (m)	G/A	G/A	G	T	NEG	NEG	A	C/T	C	C	T	A	T	G	T	T	G/T	A	A	G	T	A	A	A	G	G	C/T	G/A	C/G	G/A
E13 (f)	G/A	G/A	G	T	NEG	NEG	A	C/T	C/T	A/C	T	G/A	T	A	C	C	T	G	G	G	T	A	A	A	G/A	C/G	C/T	G	C	G/A
S14 (f)	G	A	G	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C	C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	C	G/T	G/A	G/A	G	C/T	A	G/A	A	G/A	G/C	T	G/A	G	A
E14 (m)	G	G	G	C/T	NEG	NEG	C	C/T	C/T	A/C	T	G/A	C/T	G	T	C	G	G/A	G/A	G/A	C	G	G/A	A	G/A	G/C	T	G/A	C/G	A

Sonde	AP1B1-765	AP1B1-051	BSG-637	BTBD2-045	CKB-505	CKB-283	DAD1-621	DDOST-704	GOT2-636	GOT2-842	ID3-096	LASP1-989	LDLR-925	MCM3AP-173	MCM3AP-181	MCM3AP-450	MIRPL9-480	NFKBIA-696	NFKBIA-904	PGD-567	POLR2L-591	PTOV1-996	PTTG1IP-314	RPN1-697	SART1-435	SART1-118	SRP14-208	TACCI-586	TCEB2-855	TFRC-672
Paar	SNP	G/A	G/A	G/A	C/T	C/T	C/T	A/C	C/T	C/T	A/C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	G/T	G/A	G/A	G/A	C/T	A/C	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C/G	G/A
S15 (f)	G/A	G/A	G	C	NEG	NEG	A/C	C/T	C	C	C/T	G	C	G/A	NEG	C	G	G/A	G/A	G/A	C	A	A	NEG	A	C	C/T	G/A	G	A
E15 (m)	A	G	G/A	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C/T	A/C	T-C/T	A	C	G-G/A	C	C	G	A	A	G/A	C	A	G/A	G/A	G/A			A		A
E16 (f)	G/A	G/A	G/A	C/T	NEG	NEG	C	C/T	C/T	A/C	C	G	T	G	T	C/T	T	A	A	G/A	C/T	A	G	A	G/A	C/G	C/T	G/A	G	G
S16 (m)	G/A	G/A	A-G/A	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C/T	A/C	C	G	T	G	C/T	C	G/T	G/A	G/A	G/A	C/T	A	G/A	A	G/A	C/G	T	G	G	G
S17 (f)	G	G/A	G/A	T	NEG	NEG	A	T	C/T	A/C	C	G/A	C/T	G	T	T	G	G/A	G/A	G	C	A-C	G/A	G/A	G/A	C/G	T	A	G	G/A
E17 (f)	A	G	G/A	T-C/T	NEG	NEG	A	T	C	C	T	G/A	T	G	T	T	G	G	G	G	C/T	A	G/A	G/A	G	G	T	G/A	C/G	G/A
S18 (f)	G/A	G	A	C/T	NEG	NEG	C	T	T	A	C	G/A	T	G/A	T	T	G/T	G	G	G/A	T	A	A	G/A	G	G	T	G/A	C	G/A
E18 (f)	G/A	G	A	C	NEG	NEG	C	T	C	C	C	A	T	G	T	T	T	G	G	A	T	A	A	G/A	A	G	C-T	A	C	G/A
S19 (f)	G/A	G/A	G/A	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C/T	A/C	T	G/A	C	G/A	C	C	G/T	G/A	G/A	G	C	A	G/A	A	G/A	C/G	C/T	G/A	C	G/A
E19 (m)	G/A	G/A	G/A	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C/T	A/C	T	G	C	G/A	C/T	C/T	T	G/A	G/A	G	C	A	A	G	G/A	C/G	C/T	G	C	G/A
E20 (m)	G/A	G	A	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C/T	A	C/T	A	T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G	C/T	A	G	G	G/A	C/G	C/T	G/A	G	G/A
S20 (m)	G/A	G	A	C	NEG	NEG	A	C/T	C/T	C/A	T	G/A	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	A	A	G	T	A	A	G/A	G/A	C/G	T-C/T	G/A	G	A
S21 (m)	NEG	A	G	T	NEG	NEG	A	T	C/T	NEG	T	G/A	T	NEG	NEG	C	G	G	G	G/A	C/T	A	NEG	A	G/A	C/G	C/T	NEG	G	G/A
E21 (f)	G	G	G/A	T	NEG	NEG	A/C	C/T	C	C	T	G/A	T	G	T	C/T	G/T	A	A	G	T	A	G	A	G/A	C/G	C/T	A	C/G	G/A

Sonde																														
Paar	AP1B1-765	AP1B1-051	BSG-637	BTBD2-045	CKB-505	CKB-283	DADI-621	DDOST-704	GOT2-636	GOT2-842	ID3-096	LASP1-989	LDLR-925	MCM3AP-173	MCM3AP-181	MCM3AP-450	MIRPL9-480	NFKBIA-696	NFKBIA-904	PGD-567	POLR2L-591	PTOV1-996	PTTG1IP-314	RPNI-697	SART1-435	SART1-118	SRP14-208	TACCI-586	TCEB2-855	TFRC-672
SNP	G/A	G/A	G/A	C/T	C/T	C/T	A/C	C/T	C/T	A/C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G/A	C/T	A/C	G/A	G/A	G/A	C/G	C/T	G/A	C/G	G/A
E22 (m)	G/A	G/A	A	C/T	NEG	NEG	A	T	C/T	A/C	C	G	C	G/A	C/T	C/T	G	G	G	G	T	A	A	G/A	G/A	C/G	C/T	A	G	G/A
S22 (m)	G	G/A	A	T	NEG	NEG	A	T	C	C	C	G	C	G/A	C/T	C/T	G/T	G	G	G	T	A	A	A	G/A	C/G	C/T	A	G	G/A
E23 (m)	A	G	A	T	NEG	NEG	A	C/T	C	C	C	G	C	G/A	C/T	C/T	G/T	A	A	G	C/T	A	G/A	A	G	G	T	G	G	G/A
S23 (m)	A	G	G/A	C/T	NEG	NEG	A	C/T	C	C	C	G	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A	G/A	G	C	A	G/A	A	G	C-G	T	G	C/G	G/A
S24 (m)	A	G	G	T	NEG	NEG	A	C	T	A/C	T	G/A	C	G/A	C/T	C/T	G/T	G	G	G	T	A	A	G/A	A	C/G-C	C/T	G	G	G
E24 (f)	A	G	G	T	NEG	NEG	A	C	C	C	T	G/A	C/T	G/A	C	C	T	G	G	G	T	A	G	G/A	A	C	C/T	G/A	G	G/A

Tab. 5.4 Zu erkennen sind an der linken Ausrichtung die Geschwisterpaare mit Spender (S) und Empfänger (E) und deren SNP unter dem jeweiligen Gen, angegeben mit den 3 letzten Ziffern des entsprechenden SNPs(s.a. Tab. 9.1). Zur Farberläuterung: gelb = unterschiedlicher SNP innerhalb des Geschwisterpaares durch die man sie unterscheiden kann; blau = nur die Messung der Mini-Sequenzierung (M-S) ist angegeben, da die Sequenzierung (S) negativ oder unklar ausfiel; grün = nur die Messung der S ist angegeben, da die M-S negativ oder unklar ausfiel; rosa = beide Messungen waren negativ /unklar; rot = keine Übereinstimmung der beiden Messverfahren, erste Angabe entspricht der M-S - dann die der S.

Insgesamt wurden über 1470 Mini-Sequenzierungen an Patientenmaterial bearbeitet, von denen 67 (4,6%) entweder negativ oder so undeutlich ausfielen, aufgrund dessen man sie nicht zweifelsfrei der Base zuordnen konnte. Die zur Überprüfung eingesetzten Sequenzierungen, wobei jede der über 400 Kontrollen zur Erhöhung der Effizienz jeweils mit dem Forward-, als auch mit dem Revers-Primer durchgeführt wurde, konnten 75 mal (18,75%) den SNP nicht eindeutig erkennen. Allerdings lag die Anzahl der SNPs, welche von beiden Methoden nicht gewiss bestimmt werden konnten mit 56 Analysen relativ hoch. Die Ursache dieser Messungen, welche hauptsächlich bei den Primern CKB-rs12505 und CKB-rs1803283 oder bei cDNA von den Patienten S15 und E/S21 zu finden war, liegt daher vermutlich im fehlerhaften Material (Primer) oder in der Herstellung (cDNA der Patienten).

Bei 16 (1,01% bzw. 4,0%) Messungen ermittelten die beiden Verfahren unterschiedliche Ergebnisse, die auch nach wiederholten Untersuchungen nicht klar einem bestimmten Polymorphismus zugewiesen werden konnten.

Aus den Analysen schließend liegt die Wahrscheinlichkeit, ein HLA-identisches Geschwisterpaar mittels der ausgewählten 30 SNP-Systeme nicht voneinander unterscheiden zu können bei 0,00017%. Dementsprechend befindet sich die Wahrscheinlichkeit der Differenzierung bei 99,99983%. Zusätzlich zeigte sich, dass die drei Primerpaare der Gene GOT2-rs257636 (66,7%), POLR2L-rs6591 (50%) und TACC1-rs2013586 (50%) sogar alleine in der Lage alle 24 Geschwisterpaare anhand ihres SNPs mittels der Methode der Mini-Sequenzierung zu verifizieren. Zusammen mit den ebenfalls sehr überzeugenden Primern GOT2-rs30842 (58,3%) und SART1-rs550435 (41,7%) wäre dies, auch bezüglich der Länge der PCR-Produkte, eine optimale Fünf-Plex zur Bestimmung des Chimärismus bei Patienten nach HSZT.

5.8 Minor-Histokompatibilitätsantigene

Im Hinblick auf die Anwesenheit von Minor-Histokompatibilitätsantigenen (mHAGs), gingen wir der Frage nach, bei welchen, der von uns getesteten SNPs, es aufgrund der Variation in der cDNA zu einer Veränderung einer Aminosäure kommt. Mit Hilfe der NCBI-Datenbank konnten wir bei sechs der 30 SNPs einen Austausch der Aminosäure registrieren, der daraufhin zu einer Missens Mutation führt und einen möglichen Angriffspunkt in der Entstehung einer GvHD liefert.

Gen	rs-Nummer	Funktion	Chr.	SNP/AS	Position mRNA/Protein
CKB	12505	Kreatinkinase (hpts. im Gehirn)	14	CTC/TTC Leu/Phe	1158/360
GOT2	30842	Glutamat-Oxalacetat Transaminase 2	16	GTC/GCC Val/Gly	327/71
MRPL9	8480	mitochondriales ribosomales Protein L9	1	GAA/GCA Glu/Ala	714/210
SART1	660118	involviert in der Regulation von Zellproliferation, Epitope werden von Zytotoxischen T-Zellen registriert, mögliche Assoziation zur Atopie	11	GGG/GCG Gly/Ala	1546/485
SRP14	16924521	Signal-Erkennungs-Partikel, RNA Bindeprotein	15	GCA/ACA Ala/Thr	451/127
TFRC	3817672	Transferrin-Rezeptor (p90, CD71), Regulation im Eisenhaushalt	3	GGC/AGC Gly/Ser	707/142

Tab. 5.5 Darstellung der sechs SNPs mit dazugehöriger rs-Nummer und kurzer Erläuterung über deren Funktion. Des Weiteren, Angaben über die ausgetauschte Aminosäure (AS) und deren Position bezüglich des Chromosoms (Chr.) und der mRNA bzw. des Proteins. Rötlich markiert ist hierbei der SNP der zu dem Wechsel der AS führt.

Daraufhin verglichen wir die Daten unserer SNP-Analysen, wobei hierbei zum Einen eine homozygote Differenz und zum Anderen das Vorliegen eines heterozygoten Empfängers bei homozygotem Spender von Interesse waren. Beim SNP 30842 des GOT2-Gens fanden wir vier homozygot differente Geschwister (Paar 1,7,8 und 18) sowie weitere vier Geschwisterpaare (13, 14, 15, 22), bei denen der Empfänger

heterozygot war, der zugehörige Spender jedoch homozygot. Auf dem Gen MRPL9-rs8480 zeigten sich ebenfalls zwei Paare (9, 21) mit heterogenem Empfängerprofil bei homozygotem Spender. Des Weiteren konnten wir bei dem Gen SART1-rs660118 eine Missens Mutation bei vier Geschwisterpaaren feststellen, eine davon homozygot ausgeprägt (8), drei weitere durch heterozygote Empfänger (1, 3, 13). In dem SNP SRP14-rs16924521 unterscheidet sich ein Geschwisterpaar durch einen heterozygoten Empfänger (16), TFRC-rs3817672 differenzierte diesbezüglich vier Paare mittels heterozygotem Empfänger (3, 9, 20, 24) und ein Paar homozygot (5). Lediglich der SNP rs12505 des Genes CKB wies keine derartige Differenzierung der Geschwister auf.

6 Diskussion

Gemäß der Zielsetzung, mittels einer spezifischen PCR Individuen auf Ebene der cDNA zu identifizieren, nutzten wir für diese Aufgabe Einzelpolymorphismen (SNPs), welche sich in kodierenden Bereichen konstitutiv exprimierter Gene befinden sollten. Hierfür selektierten wir publizierte SNPs aus dem kodierenden Bereich konstitutiv exprimierter Gene anhand definierter Charakteristika. Diese Charakteristika waren, neben der konstitutiven Expression, eine hohe Heterozygotenfrequenz und die Möglichkeit, eine PCR des SNP-kodierenden Bereichs so zu etablieren, dass mindestens eine Intron-Exon-Grenze eingeschlossen werden konnte. Diesen Kriterien folgend, etablierten wir eine 30 SNP-Systeme umfassende Multiplex-PCR. Mit Hilfe dieser war es möglich, 24 HLA-identische Geschwisterpaare mit der Methode der Minisequenzierung zu unterscheiden.

6.1 Methoden der Chimärismusbestimmung

Der Wunsch, die mit Morbidität und Mortalität verbundene GvHD von dem positiven Effekt der GvL zu trennen, stellt eine noch nicht geklärte Herausforderung dar, dessen Verstehen in der Beobachtung des Chimärismus hämatopoetischer Zellen seinen Ansatz findet. So liegt es nahe, dass eine zuverlässige Bestimmung des Chimärismus wichtig ist, um dessen Einfluss auf immunologische Prozesse, wie die GvHD und den GvL-Effekt im Körper eines transplantierten Menschen, besser zu verstehen. Ebenso macht das Wissen um die Dynamik des Spenderchimärismus nach Transplantation, die Bedeutung eines schnellen und leicht durchführbaren Verfahrens zur Eruiierung des Chimärismus deutlich. Das Problem, welches sich aus den unterschiedlichen Aussagen bezüglich der Rolle und auch aus der Möglichkeit einer Beeinflussung des Chimärismus ergibt, könnte an den noch nicht standardisierten Verfahren und zudem in der zeitlichen Abfolge durchgeführter Chimärismusanalysen liegen. Aus diesem Grund wurde bereits in der Vergangenheit versucht die Bestimmungen des Chimärismus um zusätzliche Aussagen zu erweitern (Antin et al. 2001).

Bedingt durch den hohen Zeitaufwand und hinsichtlich einer limitierten Sensitivität und Genauigkeit fanden frühere Methoden wie die Erythrozyten-Phänotypisierung, die Analyse der Zytogenetik und die Untersuchung des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) keine große Anwendung in der Klinik (Baron & Sandmaier 2006).

Heutzutage stehen modernere Methoden zur Auswertung des Chimärismus zur Verfügung, wozu auch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zählt. Der Nachweis erfolgt auf Ebene der Einzelzelle und wird optisch ausgewertet, so dass dieses Verfahren insbesondere zum Nachweis von Nukleinsäuren in isolierten Zellen oder in Zellen im Gewebeverband eingesetzt wird. Allerdings kann sie nur verwendet werden, wenn Spender und Empfänger unterschiedlichen Geschlechts sind. Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Patienten hätten wir mit dieser Methode nur 11 von insgesamt 24 Geschwisterpaaren untersuchen können. Dennoch zählt die FISH-Analyse angesichts der hohen Sensitivität und Präzision und der Anwendbarkeit bei kleineren Proben (Hibi et al. 1997) zu einem der meist durchgeführten Verfahren bei geschlechtsdifferenten Spendern und Empfängern (Najfeld et al. 1997; Seong et al. 2000).

Die Untersuchung von genomischen Polymorphismen in nicht kodierenden Genen durch die STR- oder die VNTR-Analyse mittels Real-Time-PCR erlaubt im Gegensatz dazu die zuverlässige quantitative Analyse des Spenderchimärismus mit einer ausreichenden Sensitivität und unabhängig vom Geschlecht (Schneider et al. 2005). Dieses Verfahren wird daher in der Routine zur Untersuchung des Chimärismus im peripheren Blut und im Knochenmark verwendet (Thiede et al. 2001).

Der Nachweis von einzelnen Nukleotid Polymorphismen (SNPs) rückte spätestens seit den Ergebnissen, die Alizadeh mit der Detektion von SNPs in einer Real-time PCR erzielen konnte in den Mittelpunkt des Interesses (Alizadeh et al. 2002). Insbesondere auch im Hinblick auf die Detektion einer MRD (engl.: minimal residual disease) ist die hohe Sensitivität bei der Real-time PCR von Vorteil, trotz zum Teil noch erhöhter falsch-positiver Ergebnisse.

Zur kurzen Übersicht sind noch einmal die drei gängigsten Methoden in Tabelle 6.1 veranschaulicht.

Technik	X/Y-FISH	STR/VNTR	Real-time PCR
Anwendung	Einzelne Zellen/ Gewebe	Blut, Knochenmark, isolierte Zellen	Blut, Knochenmark, Isolierte Zellen
Sensitivität	0,1 -2 %	1-5 %	0,001-1 %
Aussagekraft	Sehr hoch	Hoch	Moderat
Vorteile	Hohe Sensitivität, niedrige fälsch- positive Rate, verarbeitet hohe Zellzahlen	Schnell, sehr großer Anwendungsbereich, geschlechtsunabhängig	Sehr schnell, Sehr hohe Sensitivität
Nachteile	Geschlechtsabhängig	Mittelmäßige Sensitivität	Hohe falsch-positive Rate

Tabelle 6.1 Vergleich dreier Methoden zur Bestimmung des Chimärismus, aufgeteilt in Anwendung, Sensitivität, Aussagekraft des Verfahren und den jeweiligen Vor- und Nachteilen. Die Daten entstammen aus Reviews von Bader und Baron (Bader et al. 2005; Baron & Sandmaier 2006)

6.1.1 Möglichkeiten der SNP-Analyse

Es gibt unterschiedliche Verfahren, welche zur SNP-Analyse genutzt werden, wobei manche dieser Methoden, wie der Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) und die Hybridisierung mit allelspezifischen Primern auch eine Quantifizierung ermöglicht. Dennoch entschieden wir uns für die Methodik der Mini-Sequenzierung. Basierend auf dem Prinzip der PCR können mit dieser Technik selbst sehr kleine Proben mit einem hohen Maß an Präzision amplifiziert werden (Pastinen et al. 1997). Im Gegensatz zu Methoden, die zur Differenzierung größere Abschnitte der DNA analysieren müssen, ermöglicht der gezielte Nachweis einzelner Nukleotide eine höhere Effizienz in der Anzahl durchgeführter Untersuchungen. Dies wird u.a. auch durch die

hohe Multiplexfähigkeit, über welche die Mini-Sequenzierung in Anwendung mit fluoreszierenden ddNTPs verfügt, erreicht (Sanchez et al. 2003). Ferner findet durch die Mini-Sequenzierung nicht nur eine Differenzierung der Patienten statt, sondern auch die Entdeckung individueller Unterschiede. Neben diesen Aspekten und aufgrund finanzieller Hinsicht stellte die einfache Handhabung, dank speziell entwickelter Kits (SNaPshot) und insbesondere die unkomplizierte Verarbeitung der Proben mit der Kapillarelektrophorese, einen wesentlichen Grund zur Anwendung der Mini-Sequenzierung dar. Die zur Überwachung der Effektivität der Mini-Sequenzierung durchgeführten Kontrollen wurden mit Hilfe von Sequenzierungen der jeweiligen DNA-Bereiche unternommen und konnten den hohen Aussagewert des Verfahrens bestätigen. Es zeigte sich sogar unter Anwendung der Mini-Sequenzierung eine weitaus geringere Rate an Messungen, unter die ein SNP nicht mit Sicherheit detektiert werden konnte (4,6%), als bei Jenen im Vergleich zu den durchgeführten Sequenzierungen (18,75%). Allerdings lassen sich die doch recht hohen Zahlen in Anbetracht der Ergebnisse vermutlich durch einen Defekt der Durchführung bei Messungen des CKB-Genes beider Techniken auf 1,3% bei der Mini-Sequenzierung und auf 6,25% bei der Sequenzierung relativieren.

6.1.2 STR versus SNP

Die Methoden der STR-Analyse und der Untersuchung von SNPs stellen die zurzeit wichtigsten Verfahren zur geschlechtsunabhängigen Bestimmung des Chimärismus hämatopoetischer Zellen nach HSZT dar. Betrachtet man zunächst eine der wesentlichsten Funktionen, nämlich die Unterscheidung von Patientenmaterial, so konnte sich die STR-Methode im Laufe der Jahre profilieren, indem sie durch eine mittlerweile etablierte Vorgehensweise alle Patienten von neun über das Genom verteilte STR und einer geschlechtsspezifischen Sonde zweifelsfrei identifizieren konnte. Dahingegen wurden bei Studien, welche SNPs zur Hilfe nahmen teilweise niedrigere Differenzierungsraten beobachtet (Bader et al. 2005). Durch eine in der Rechtsmedizin der Universität in Mainz etablierte Methode zur Untersuchung von degradiertes DNA (Bender et al. 2004) konnte sogar bei sehr kleinen Proben die Langerhans Zellen aus Patientenmaterial, basierend auf dem STR-Verfahren im

Hinblick auf den Chimärismus, genauestens dem Empfänger bzw. dem Spender zugeordnet werden.

Untersuchungen ergaben, dass man, um eine vergleichbare Aussage wie die von 15 STR zu erhalten, mindestens 50 SNPs testen müsse, und dies nur unter der Voraussetzung einer Heterozygotenfrequenz um die 50%. Andernfalls läge die Anzahl der zu analysierenden SNPs um die 100-150 (Gill 2001). Viele Untersuchungen zum Identitätsnachweis anderer Gruppen fanden bisher an genomischen SNPs statt, wie auch an der vorangegangenen Arbeit zum proof-of-principle in unserer eigenen Arbeitsgruppe (Bakhtiar 2009). Der Unterschied in dieser Arbeit lag nun in der Selektion der SNPs, welche sich in kodierenden Abschnitten von konstitutiv exprimierten Genen, sprich auf sog. housekeeping Genen, befanden.

Der Grund, weshalb wir dennoch in der Lage waren mit nur 30 SNPs jeden der 24 HLA-identisch transplantierten Geschwisterpaare untereinander zu differenzieren, lag in der Selektion der Polymorphismen. Insgesamt 674 Gene wurden auf SNPs in Bereichen kodierender DNA hin analysiert. Die Anzahl der 67 SNPs, welche die zuvor ausgesuchten Kriterien, wie Heterozygotenfrequenz, Intron/Exon-Grenze, die Möglichkeit des Designs von Primern und Mini-Sequenzierungs-Sonden und die konstitutive Expression erfüllten, reduzierte sich insbesondere aufgrund ungenügender Gewebeexpression oder Differenzierungen in der Mini-Sequenzierung auf 30 SNP-Systeme. Diese Auslese scheint der Grund dafür zu sein, dass wir allein mit der Methode der Mini-Sequenzierung im Stande waren, die Ergebnisse rückblickend betrachtend, sogar mit Hilfe allein dreier SNPs, nämlich GOT2-rs 30842, POL2RL2-rs 6591 und TACC1-rs 201358, alle 24 untersuchten Geschwisterpaare voneinander zu unterscheiden. Die Wahrscheinlichkeit, ein HLA-identisches Geschwisterpaar mittels der ausgewählten 30 SNP-Systeme nicht voneinander unterscheiden zu können liegt bei 0,00017%, dementsprechend befindet sich die Wahrscheinlichkeit der Differenzierung bei 99,99983%. Zur Bestimmung der Verteilung des vorliegenden Chimärismus wäre dahingehend noch eine Quantifizierung vonnöten. Somit liegt die Perspektive der SNP-Analysen vor allem in der Detektion mittels einer Real-time-PCR, die neben dem Identitätsnachweis auch die Möglichkeit der Quantifizierung bietet (Alizadeh et al. 2002). Zusätzlich liefert dieses Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität weitaus genauere Daten als die Methode über STR (Fredriksson et al. 2004). Daraus ergibt sich

die Möglichkeit, die bisher bestehenden Grenzen in Bezug auf die Sensitivität zu überschreiten, da auch kleinste Mengen an residualen Leukämiezellen aufgespürt werden können, um mittels frühzeitiger Intervention Rezidive zu verhindern. Dem entgegen steht allerdings die zugleich recht hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen, welche durch das sensible Ansprechen des Verfahrens verursacht werden, wohingegen die Untersuchungen anhand STR eine hohe Präzision aufweisen (Thiede et al. 2004). Ein weiterer Faktor, der die Analysen mittels SNPs bevorzugt, ist ein höheres Vorkommen auf dem Genom mit zugleich geringer Mutationsrate im Vergleich zu STRs (Landegren et al. 1998). Obwohl die STR-Methode noch als Gold-Standard zur Eruierung des Chimärismus zählt (Bader et al. 2005), so findet dennoch ein Wechsel hin zu Analysen der Polymorphismen statt. Nicht nur durch die Erhöhung der Sensitivität durch die Quantifizierung, sondern auch durch die Vereinfachung und die Erleichterung der Automatisierung zur Bestimmung des Chimärismus gewinnen sie zunehmend an Bedeutung (Fredriksson et al. 2004).

Der wahrscheinlich größte Vorteil der sich gerade im Bezug auf die Untersuchung der SNPs auf Ebene der cDNA ergibt und aufgrund wir dieses Verfahren anwandten ist, dass nicht nur Aussagen über den bestehenden Chimärismus, sondern auch Hinweise auf den Zustand der untersuchten Zellen getroffen werden kann.

6.1.3 Vorteile der cDNA-basierten Chimärismusanalyse

Wie zuvor erwähnt, ermöglicht die Untersuchungen auf Ebene der cDNA weitere Einsicht in die Zelle, als nur ihre Herkunft. Als Abbild der Zelle erlaubt die Verarbeitung der mRNA hin zur cDNA, welche die momentane Expression von Proteinen repräsentiert, Rückschlüsse über ihren Zustand. Gerade im Hinblick auf Langerhans Zellen ist bekannt, dass sie während ihrer Reifung, welche sie nach Antigenkontakt durchläuft, ihren Zellzyklus und ihre Expression bestimmter Gene reguliert. Dementsprechend werden Moleküle, welche die Antigenpräsentation fördern, wie Proteine der MHC-Klasse-II oder der endosomalen Prozessierung nach unten reguliert, wohingegen die Produktion von Adhäsionsmolekülen, Homing-Rezeptoren und kostimulatorischen Signalen wie Zytokine oder Chemokine zur Anlockung und Proliferation von T-Lymphozyten gesteigert wird (Kämpgen 2001).

Marker diesbezüglich könnten gezielt eingesetzt werden um so den Status der Zelle zu verifizieren, was nähere Einblicke in den Lebenszyklus der LZ bringen und so das Verständnis der Interaktionen auch im Bezug auf andere Zellen vertiefen könnte. Mit dem Wissen der, für eine Immunreaktion wie die GvHD bzw. die GvL, relevanten Zellen und stimulierenden Faktoren ergeben sich daraus neue Ansätze, um mit spezifischen, u.a. für die Zelle abhängigen Markern den Zustand, gerade auch bezüglich einer Aktivierung auszumachen und diese im nächsten Schritt zu manipulieren.

Die aus einem komplexen Zusammenspiel resultierende GvHD findet, neben anderen Faktoren, ihre Ursache in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Dementsprechend wurde bei Patienten, die eine akute GvHD aufwiesen, eine erhöhte Serumkonzentration von Molekülen wie TNF- α , IFN- γ (Interferon), IL-1, IL-2 und IL-6 registriert (Holler et al. 1993), obwohl dies auch bei Infektionen oder nach Medikamentengabe auftreten kann. Allerdings konnte IL-2 aufgrund einer beobachteten Korrelation zwischen einem gestiegenen Titer löslicher Rezeptoren und dem Schweregrad der Immunreaktion als ein Anzeichen einer GvHD ermittelt werden (Grimm et al. 1998).

Als Beispiel für die klinische Bedeutung, welche hinter diesen Forschungsergebnissen steckt, konnte Holler eine signifikante Reduktion des Auftretens einer GvHD nach prophylaktischer Gabe von Anti-TNF- α -Antikörpern beobachten (Holler et al. 1998).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass genetische Polymorphismen, welche in Bereichen des Gens für TNF- α (inflammatorische Wirkung) und des IL-10 Gens (antiinflammatorische Wirkung) als Risikofaktoren in der Entstehung einer GvHD eine Rolle spielen (Karrer 2003).

6.2 Optimierung der Methoden

Gerade in Anbetracht der Entdeckung immer neuer Polymorphismen ergeben sich daraus noch viele Möglichkeiten weitere Merkmale in die Auslese zu integrieren, wobei die Zahl derer, welche unseren Anforderungen entsprächen, natürlich begrenzt ist, hauptsächlich im Hinblick auf die konstitutive Expression. Die Einführung neuer gewebsspezifischer Marker, wie Langerin und Zytokeratin, die bereits erfolgreich

seitens unserer Arbeitsgruppe etabliert wurden, können zur Detektion und Quantifizierung von Zellkontaminationen in einer Präparation genutzt werden.

Ein Ansatz um die Präzision der Amplifikation zu erhöhen, liegt u.a. in dem Ausbau der Anwendung einer Nested-PCR, welche zum Teil in unserer Arbeitsgruppe in Gebrauch ist. So wurden die Primer der 30 SNP-Systeme so gewählt, dass zusätzlich Primer im weiter äußeren Bereich des Gens liegend generiert werden können. Kontaminationen genomischer DNA wiederum werden durch den Einbau von Intro-Exon-Grenzen in der Auswahl der Primer aufgespürt.

Weitere Bemühungen zur Analyse von sehr kleinen Proben, welche sich oft aus der geringen Anzahl der extrahierten LZ der Patienten ergeben, bis hin zu Untersuchungen einzelner Zellen mit der Durchführung einer Single-Cell-PCR, befinden sich zur Zeit in der Entwicklung. Durch diese Verfahren können zum Einen selbst kleinste Zellbestände amplifiziert und anschließend analysiert werden, wodurch zugleich sehr hohe Aussagewerte der Population gegenüber getroffen werden kann. Zum Anderen ermöglicht die Verfeinerung dieser Methoden einen besseren Nachweis bestehender Kontaminationen.

6.2.1 Quantifizierung

Eine der vielversprechendsten Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Chimärismus stellt die Real-time-PCR dar, welche sich bereits aufgrund ihrer enorm hohen Sensitivität und des einfachen Handlings bewährt hat (Fredriksson et al. 2004); (Alizadeh et al. 2002). Dank SNP-spezifischer Marker kann so die Zuordnung des Ursprungsgewebes und die Quantifizierung des Chimärismus stattfinden, was im Bezug auf die klinische Anwendung einen immensen Nutzen mit sich bringt und dieser Vorteil auch seitens unserer Arbeitsgruppe ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit etablierten SNP-Systeme bereits genutzt wird.

6.3 Evaluation der SNPs

Die Entdeckung von interindividuellen Nukleotidpolymorphismen ist für viele Bereiche der Forschung von Interesse. Neben den bereits ausführlich beschriebenen Möglichkeiten zur Analyse des Chimärismus und dem zunehmenden Gebrauch in der forensischen Genetik, scheinen die Polymorphismen aufgrund ihrer langsamen Mutationsrate und ihrer Stabilität ideal für Populationsgenetische als auch für Evolutionsgeschichtliche Untersuchungen zu sein (Underhill et al. 2000).

Auch für die Klinik spielen diese Polymorphismen in unterschiedlichen Zusammenhängen eine wichtige Rolle. So können SNPs in Zytokingenen oder in den Genen von Rezeptoren auf Leukozyten Einfluss auf Entstehungsprozesse bei einer Reihe von Erkrankungen haben. Dass der Austausch einer einzigen Base zu einem Leiden führen kann, dokumentiert das Beispiel des Krankheitsbildes der Zystischen Fibrose, die, ausgelöst durch einen Aminosäure-Wechsel, eine Verminderung der Funktion eines tragenden Chloridkanals nach sich zieht. Allerdings vermutet man die Ursache von den meisten Krankheiten, die durch SNPs verursacht sein könnten, in einem Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren. Gerade Polymorphismen, die sich in kodierenden Abschnitten der DNA befinden, werden verdächtigt in einer Vielzahl prädisponierend auf die Entstehung bestimmter Krankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer (Kuwano et al. 2006; Martin et al. 2000), Diabetes Typ II (Altshuler et al. 2000) oder das Mammakarzinom (Kammerer et al. 2005) zu sein. Abgesehen von den cSNPs, die befähigt sind Missens Mutationen zu verursachen, ist die Detektion von Variationen in Promotorregionen besonders gefragt (Brookes 1999). Dort lokalisierte Polymorphismen können die komplette Produktion von bestimmten Proteinen sowohl stimulieren als auch zum Erliegen bringen.

Ein anderer Aspekt, der den Nachweis weiterer SNPs vorantreibt, liegt in dem unterschiedlichen Ansprechen von Individuen auf verschiedene Medikamente. Beobachtungen über genetische Variationen in Genen, die am Prozess der Metabolisierung von Medikamenten eingebunden sind, ergaben Assoziationen bezüglich der Reaktion auf Medikamente (Kim & Misra 2007). So z.B. ergaben Studien unter Anwendung verschiedener Blutdruckmedikamente einen größeren Benefit beim Auftreten bestimmter Variationen im APO-B-Gen (Liljedahl et al. 2004), ein zusätzlich erhöhtes Risiko einer Blutung bei Warfaringabe bei Polymorphismen des CYP2C9-

Gens (Higashi et al. 2002) oder eine Carbamazepin-Hypersensitivität (Neuroleptikum) bestimmter Ausprägungen eines SNPs auf der Promotorregion von TNF- α (Pirmohamed et al. 2001).

Das längerfristige Ziel dieser Untersuchungen ist die Möglichkeit die Auswirkungen im positiven als auch im negativen Sinne bereits im Vorhinein dank Polymorphismusbestimmungen vorhersagen zu können und diese zu fördern respektive zu unterbinden, was einen großen Schritt in dem Prozess der individualisierten Medizin bedeuten würde. Aufgrund dessen haben es sich viele Arbeitsgruppen zum Ziel gemacht, weitere SNPs und ihre Einflüsse auf den menschlichen Körper zu erforschen und diese Informationen, als eine Art neues Genom-Projekt, in riesigen Datenbanken zu sammeln (Kim & Misra 2007; Kruglyak & Nickerson 2001).

6.4 Minor-Mismatch

Im Kontext der allogenen Blutstammzelltransplantation können Polymorphismen in kodierenden Genen, die zu einem Austausch von Aminosäuren führen, immunogene Neoepitope generieren. Werden die Polymorphismus-kodierten Epitope von T-Zellen eines Stammzellspenders erkannt, werden sie als „Minor-Histokompatibilitätsantigene“ (mHAg) bezeichnet. Zur Identifizierung von mHAg wurden ebenfalls SNP-Datenpools generiert (Van Bergen et al.), die auf diesem Wege allo-reaktive T-Zellen von Stammzellspendern durch ein „whole genome association scanning“ charakterisiert wurden.

Diese non-synonymen Polymorphismen machen Studien zufolge um die 40% der kodierenden SNPs (cSNPs) aus und sind aufgrund ihrer Eigenschaft bei immunologischen Reaktionen von großem Interesse (Cargill et al. 1999). Ihre Bedeutung in der Entstehung eines GvL-Effektes sowie einer GvHD wurden bereits mehrfach belegt (Falkenburg et al. 2003; Goulmy et al. 1996).

Nach einer Überprüfung unserer SNPs ergab sich bei 6 der 30 SNPs (s. Tab. 5.5), dass sie zu einer Missens Mutation in Bezug auf das Protein führen, was aber keine Auswirkungen auf unsere Untersuchungen hatte. Allerdings können sie wie jede Variation auch, die zu einer Veränderung des präsentierten Peptides führt, neue

Angriffspunkte zur Stimulation von T-Zellen führen, was ein weiteres großes Feld der Nutzung SNP-spezifischer Analysen bedeutet.

Mittlerweile konnten eine Reihe von mHAGs auf den unterschiedlichsten Geweben identifiziert werden, wobei natürlich Gene, die direkt mit der Antigenpräsentation assoziiert werden im Augenmerk stehen. Besonders gut dokumentiert ist das HA-1-Gen welches, Studien zufolge, nur auf Zellen des hämatopoetischen Systems sowie auf einigen soliden Tumoren exprimiert wird (de Bueger et al. 1992; den Haan et al. 1998), nicht jedoch auf Zielzellen einer GvHD (Hudecek et al. 2008). Dies stellt einen interessanten Ansatz zur Stärkung des GvL-Effektes durch eine HA-1-spezifische Immuntherapie ohne das Auftreten einer GvHD dar. Erreicht werden könnte dies z.B. mit der Anwendung zytotoxischer T-Zellen, welche gezielt auf mHAGs wie HA-1 reagieren.

6.5 Chimärismus von Subpopulationen

Die Bedeutung einer hochsensitiven Methode der Chimärismusanalyse und den Nutzen einer Verfeinerung dieser Verfahren sowie die Bestrebung hohe Reinheiten der zu analysierenden Populationen zu erlangen, wird im klinischen Alltag an Untersuchungen bestimmter Subpopulationen deutlich. Generell kann man die Analysen des Chimärismus an jeder Population der hämatopoetischen Zellen gezielt durch linienspezifische Marker einsetzen, um Kontaminationen anderer Zellen zu reduzieren und den Fokus auf Diejenigen näher zu richten, die in der Entstehung einer GvHD, aber auch eines Rezidivs wichtige Rollen einnehmen, wie T-Zellen, NK-Zellen und DZ, hier insbesondere die LZ.

Interessanterweise können Patienten, die in einer Population einen kompletten Chimärismus aufweisen, in einer anderen Zellreihe zum Teil oder komplett nur eigene Zellen besitzen, was einen sog. Split- oder auch Linien-Chimärismus definiert (Niethammer et al. 1980).

Anhand von Untersuchungen des Spenderchimärismus von CD34+ Zellen fand man eine Korrelation zwischen einem erneuten Auftreten eines Rezidivs und einem abfallenden oder inkompletten Spenderchimärismus der Subpopulation. Ferner zeigte

sich, dass der Rückgang der CD34+ Spenderchimärismus im Durchschnitt zwei Monate einer Wiedererkrankung voranging (Bornhauser et al. 2009; Thiede et al. 2001). Chimärismusanalysen von T-Zellen haben ebenfalls einen prädiktiven Wert im Bezug auf ein Rezidiv. So scheint ebenfalls unabhängig von anderen Populationen ein gemischter oder absteigender Chimärismus seitens der T-Zellen mit einem erhöhten Risiko eines Rezidivs assoziiert zu sein (Lion 2007; Mackinnon et al. 1994; Mohty & Gaugler 2008), gleichzeitig allerdings auch mit einer verminderten Rate an GvHD (Mattsson et al. 2001) und sogar mit einer erhöhten krankheitsfreien Überlebensrate (Lim et al. 2007; Montero et al. 2005). Zugleich steigt das Risiko einer GvHD bei früh vorliegendem kompletten Spenderchimärismus der T-Zellen (Baron et al. 2004; Childs et al. 1999). Die prognostische Bedeutung des T-Zellchimärismus für das Ergebnis der Transplantation und das Überleben der Patienten hängt vom Transplantationsregime ab. Die Wahl der Konditionierung, eine mögliche T-Zelldepletion und die Auswahl des Spenders beeinflussen den Verlauf des T-Zellchimärismus und damit auch seinen Aussagewert (Baron & Sandmaier 2006).

6.6 Applikation von Spenderlymphozyten

Dank der seit Jahren großen Fortschritte in der Verbesserung der Chimärismusanalysen fungiert der hämatopoetische Chimärismus inzwischen als Kriterium für das weitere Vorgehen der Behandlung. So können bei einem gemischtem Chimärismus Immunsuppressiva reduziert und/oder Spenderlymphozyten appliziert werden, die einen gemischten zu einem kompletten Chimärismus konvertieren (Bader et al. 2005; Kolb et al. 1997) und hierdurch die Wahrscheinlichkeit eines Leukämie-freien Überlebens erhöhen (Mapara et al. 2002). Ein gemischter Chimerismus hingegen scheint den positiven GvL-Effekt zu blockieren und somit für eine erhöhte Rezidivrate der Patienten verantwortlich zu sein (Roux et al. 1993).

Auch wenn ein kompletter Chimärismus daher fast schon als eine Voraussetzung für eine vollständige Remission gilt, so ist der Nutzen einer prophylaktischen DLI-Gabe für das rezidiv-freie Überleben der Patienten noch nicht endgültig geklärt (Massenkeil 2004). Gerade auch unter Berücksichtigung der schweren Komplikation einer GvHD

nach DLI-Gabe (Kolb et al. 1995; Peggs et al. 2004) erfolgten diesbezüglich Modifikationen in der Applikation der Spenderlymphozyten. Die Erkenntnis, dass zum Einen die früh nach HSZT durchgeführte DLI und zum Anderen eine sehr hohe Zelldosis mit einem erhöhten Risiko einer GvHD korreliert (Mackinnon et al. 1995), führte zu einer Bewegung hin, reduzierte Einzeldosen über mehrere Monate zu verteilen, was das Aufkommen einer GvHD deutlich verringerte (Dazzi et al. 2000). Zusätzlich zeigte sich ein vermindertes Vorkommen einer GvHD nach DLI-Gabe, welche unter Vorbehandlung CD8⁺-depletiert wurden. Einsatz finden diese CD8⁺-depletierten Spenderlymphozyten auch bei Patienten, bei denen (z.B. mittels PCR) verbliebene oder bereits neu proliferierte maligne Zellen nachgewiesen werden (MRD). Durch einen DLI-vermittelten GvL-Effekt kann es hierbei zu einem Bekämpfen residualer Leukämiezellen kommen, was wiederum den Weg zu einem kompletten Chimärismus öffnet, der für die Kontrolle der malignen Erkrankung von großer Bedeutung ist (Mapara et al. 2002; McSweeney & Storb 1999).

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Analysen an Patienten nach T-Zell-depletierter HSZT, welche über einen definierten Zeitraum CD8⁺-depletierte DLI bekamen, zeigte sich ein sehr geringes Auftreten einer GvHD, auch im Hinblick auf ein älteres Patientenkollektiv in der Studie. Zudem registrierten wir aufgrund von Untersuchungen an LZ aus Hautbiopsien nach HSZT einen Wechsel von LZ des Empfängers hin zu Zellen des Spenders (Meyer et al. 2010).

6.7 Bedeutung der Langerhans Zellen für die GvHD

Eine SNP-basierte Analyse des Chimärismus eignet sich besonders für die Untersuchung von geringen Zellzahlen, wie sie bei der Isolation aus klinischen Gewebeproben erreicht werden. Der gleichzeitige Nachweis gewebespezifisch exprimierter Gene auf cDNA-Ebene erlaubt eine Überprüfung der Reinheit der Zellpräparation. Die Motivation zur Entwicklung einer SNP-basierten Chimärismusanalyse war für uns die Möglichkeit, aus kleinen Hautbiopsien isolierte Langerhans Zellen zu untersuchen. Durch die Generierung des SNP-Pools setzten wir uns u.a. das Ziel, die extrahierten LZ zum Einen dem Spender bzw. dem Empfänger zu

ordnen zu können und zum Anderen in einem weiteren Schritt diesen bestehenden Chimärismus zu quantifizieren. Mittels Real-time PCR sind diese Verfahren nun in nur einem Schritt möglich mit zugleich hoher Sensitivität der Daten aufgrund dessen erste Analysen, basierend auf den 30 selektierten SNP-Systemen, bereits durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Das Interesse an den LZ und insbesondere auch an deren Chimärismus wuchs durch die Vermutung, dass dieser für die Entstehung einer GvHD eine Rolle spielen könnte.

Eine Möglichkeit LZ zu beeinflussen, erkannte man durch Untersuchungen von Kontaktdermatiden, wo es bei Patienten nach einer Bestrahlung mit UV-Licht zu einem verminderten Vorkommen der LZ in der Haut kam (Clydesdale et al. 2001). Merad ging noch einen Schritt weiter und stellte fest, dass UV-Licht eine Depletion von LZ des Empfängers in einem Mausmodell bewirkte und als Folge dessen das Auftreten einer akuten GvHD vermieden werden konnte (Merad et al. 2002). Auch in anderen Studien konnte an Mäusen dieser Einfluss persistierender APZ des Empfängers in der Entstehung einer GvHD beobachtet werden (Shlomchik et al. 1999). Neben weiteren Methoden zur Depletion von LZ steht insbesondere die angewandte Konditionierung in der Beeinflussung des Chimärismus in der Diskussion. Im Mausmodell führte die Transplantation T-Zell-depletierter Stammzellen zu einer Persistenz von Empfänger-LZ bis zu zwölf Monaten nach Transplantation, währenddessen eine Behandlung mit einem nicht-depletierten Transplantat oder auch unter Infusion von T-Zellen zu einem raschen Wechsel von Empfänger hin zu Spender-LZ führte (Merad et al. 2004).

Ähnliche Ergebnisse fand man zum Teil auch in Studien an Patientenkollektiven. In Studien über dendritische Zellen in der Haut nach HSZT machte Auffermann-Gretzinger die Beobachtung, dass ein inkompletter LZ-Chimärismus, also residuale LZ des Empfängers, vermehrt mit einer GvHD assoziiert ist, wohingegen nur wenige Patienten mit einem kompletten LZ-Chimärismus eine GvHD aufwiesen. Jedoch zerstreut sie die Zweifel, der genauen Aussagekraft des Chimärismus auf die GvHD bezogen nicht vollständig (Auffermann-Gretzinger et al. 2006).

Collin konnte an einem Patientenkollektiv, welches konventionell konditioniert wurde, schneller einen kompletten Chimärismus der LZ messen, als bei Jenen, die eine dosisreduzierte Behandlung hatten (Collin et al. 2006). Dieser Wechsel zu einem kompletten Chimärismus der LZ wird durch das Auftreten einer GvHD beschleunigt,

wohingegen andere APZ davon unbeeinflusst scheinen, wie z.B. Makrophagen (Haniffa et al. 2009). Eine Unsicherheit ist die zum Teil noch hohe Kontaminationsrate durch andere Zellpopulationen bei der Isolierung der LZ, hier insbesondere die Keratinozyten, welche unweigerlich zu einer Verfälschung der Daten führen kann. Um dies zu vermeiden, optimierten wir die Isolation der LZ bis auf Reinheiten von über 96%.

Ein Großteil der bisher durchgeführten Chimärismusanalysen wurde an Zellpopulationen durchgeführt, welche zuvor aus Blutproben isoliert wurden. Doch viele, für das Verständnis des immunologischen Prozesses wichtige Zellen liegen in Geweben. Zielorgane der akuten GvHD sind neben der Haut insbesondere der Darm und die Leber. Eine weitere Perspektive markerspezifischer Analysen ist daher auch die Gewinnung immunkompetenter Zellen aus Darm-/Leberproben. Diese, auf cDNA-Ebene durchgeführten Analysen könnten neben Chimärismusbestimmungen und den damit verbundenen Krankheitsverlauf auch zu einer allgemeinen Verbesserung der Diagnosesicherung einer GvHD führen und aufgrund dessen frühzeitige Interventionen eingeleitet werden.

Die Analyse des Spenderchimärismus spielt für das Verständnis immunologischer Abläufe nach allogener Blutstammzelltransplantation eine immer größer werdende Rolle. Nachdem die Untersuchung von Einzelpopulationen im peripheren Blut bereits Einzug in den klinischen Alltag gefunden hat, werden zunehmend auch Analysen von aus Gewebeproben isolierten hämatopoetischen Zellen interessant. Mit den in dieser Arbeit charakterisierten SNPs besteht die Möglichkeit einer cDNA-basierten Unterscheidung von Individuen. Wir konnten zeigen, dass selbst HLA-identische nicht syngene Geschwister mit hoher Wahrscheinlichkeit unterschieden werden können. Weitere Arbeiten zur Kombination mit Aktivierungs- und gewebespezifischen Markern sowie zur quantitativen Untersuchung des Chimärismus erlauben, diese SNP-Pools optimal zu nutzen.

7 Zusammenfassung

Nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation spielt die Zuordnung hämatopoetischer Zellen zum Spender oder Empfänger für viele transplantationsbezogene Fragestellungen eine wichtige Rolle. Unter anderem ist das Persistieren von dendritischen Zellen des Empfängers, welche allogene T-Zellen des Spenders stimulieren, ein wichtiger Schritt bei der Entstehung der akuten GVHD. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Weiterentwicklung einer Methode angestrebt, die es uns erlaubt, die Zugehörigkeit isolierter hämatopoetischer Zellen dem Spender oder dem Empfänger zuzuordnen (Chimärismusbestimmung) und gleichzeitig Aussagen über das Ursprungsgewebe und den Aktivierungszustand der Zellen machen zu können. Hierfür nutzten wir Einzelbasenpolymorphismen (SNPs). Ziel dieser Arbeit war es, einen Pool von cDNA-kodierten SNPs zu definieren, mit dem auch HLA-identische Geschwister eindeutig unterschieden werden können.

Hierfür wurden zunächst aus publizierten Datenbanken solche SNPs ausgewählt, die in kodierenden Genabschnitten konstitutiv und gewebeunabhängig auf expremierten Genen lagen und zugleich eine hohe Heterozygotenfrequenz in der europäischen Population aufwiesen. Anhand dieser Kriterien wurden mittels der NCBI-Datenbank insgesamt eine Anzahl von 208 Polymorphismen auf 150 Genen identifiziert. Anschließend erfolgte die Gestaltung von Primerpaaren zur Amplifikation der SNP-kodierenden cDNA-Abschnitte. Diese mussten mindestens eine Intron/Exon-Grenze überspannen, um genomische DNA in der PCR ausschließen zu können. Mit Hilfe der etablierten PCR-Reaktion wurden die Gene in unterschiedlichen Geweben auf ihre Expression hin überprüft. Für 45 Gene ließ sich sowohl eine entsprechende PCR etablieren als auch deren konstitutive Expression in verschiedenen hämatopoetischen Zellen nachweisen. Zur Detektion der einzelnen SNPs in der Minisequenzierung wurden Minisequenzierungs-Sonden generiert und geprüft. Im Folgenden wurden für PCR und Minisequenzierung Multiplex-Reaktionen aus vier bis sechs Reaktionen zusammengestellt. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Primerinteraktionen und die unterschiedlichen Basenlängen des PCR-Produktes berücksichtigt.

Von den 45 etablierten Einzelreaktionen waren 30 für den Multiplexansatz geeignet. Unter Anwendung dieser Multiplex-Reaktionen wurden 24 HLA-identische

Geschwisterpaare (Spender und Empfänger) getestet. Zur Kontrolle erfolgte zusätzlich eine konventionelle Sequenzierung der SNP-kodierenden Bereiche auf der cDNA der jeweiligen Proben. Mit Hilfe der SNP-Kombinationen und der etablierten Methodik waren wir in der Lage alle 24 untersuchten Geschwisterpaare in zwischen sechs und 18 SNP-Systemen zu unterscheiden.

Die Möglichkeiten, die die Analysen des Chimärismus mittels SNPs auf kodierenden Bereichen der DNA mit sich bringen, liegen nicht nur in der gleichzeitigen Bestimmung der Gewebszugehörigkeit und der Detektion des bestehenden Chimärismus sowie dessen Quantifizierung unter Anwendung einer Real-time-PCR. Vielmehr ermöglicht sie auch eine Aussage über die Genexpression der untersuchten Zelle zu machen. Dies ist insbesondere dann von Interesse, wenn geringe Zellzahlen von aus Gewebe isolierten Zellen zur Verfügung stehen. Die in dieser Arbeit etablierten Ansätze werden derzeit für eine Quantifizierung mittels real-time RCR weiterentwickelt und sollen mittelfristig insbesondere für Untersuchungen des Chimärismus von dermalen und epidermalen dendritischen Zellen der Haut und anderer Zielgewebe der GvHD verwendet werden.

8 Literaturverzeichnis

- Ackerman, A. L. & P. Cresswell: Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature Immunology* 2004, **5**, 678-684.
- Alizadeh, M., M. Bernard, B. Danic, C. Dauriac, B. Birebent, C. Lapart, T. Lamy, P. Y. Le Prise, A. Beauplet, D. Bories, G. Semana & E. Quelvenec: Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002, **99**, 4618-4625.
- Altshuler, D., J. N. Hirschhorn, M. Klannemark, C. M. Lindgren, M. C. Vohl, J. Nemes, C. R. Lane, S. F. Schaffner, S. Bolk, C. Brewer, T. Tuomi, D. Gaudet, T. J. Hudson, M. Daly, L. Groop & E. S. Lander: The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2000, **26**, 76-80.
- Ansorge, W., B. S. Sproat, J. Stegemann & C. Schwager: A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *Journal of Biochemical Biophysical Methods* 1986, **13**, 315-323.
- Antin, J. H., R. Childs, A. H. Filipovich, S. Giralt, S. Mackinnon, T. Spitzer & D. Weisdorf: Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001, **7**, 473-485.
- Auffermann-Gretzinger, S., L. Eger, M. Bornhauser, K. Schakel, U. Oelschlaegel, M. Schaich, T. Illmer, C. Thiede & G. Ehninger: Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2006, **81**, 866-873.
- Bader, P., W. Holle, T. Klingebiel, R. Handgretinger, D. Niethammer & J. Beck: Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Research* 1996, **16**, 1759-1763.
- Bader, P., D. Niethammer, A. Willasch, H. Kreyenberg & T. Klingebiel: How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* 2005, **35**, 107-119.
- Bakhtiar, S.: Entwicklung einer Methode zur cDNA-basierten Analyse des Spenderchimärismus von epidermalen Langerhanszellen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation. 2010
- Banchereau, J. & R. M. Steinman: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, **392**, 245-252.
- Barnes, D. W., M. J. Corp, J. F. Loutit & F. E. Neal: Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *British Medical Journal* 1956, **2**, 626-627.

- Barnes, D. W. & J. F. Loutit: Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *British Journal of Haematology* 1957, **3**, 241-252.
- Baron, F., J. E. Baker, R. Storb, T. A. Gooley, B. M. Sandmaier, M. B. Maris, D. G. Maloney, S. Heimfeld, D. Oparin, E. Zellmer, J. P. Radich, F. C. Grumet, K. G. Blume, T. R. Chauncey & M. T. Little: Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2004, **104**, 2254-2262.
- Baron, F., M. B. Maris, B. M. Sandmaier, B. E. Storer, M. Sorrow, R. Diaconescu, A. E. Woolfrey, T. R. Chauncey, M. E. Flowers, M. Mielcarek, D. G. Maloney & R. Storb: Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Journal of clinical Oncology* 2005, **23**, 1993-2003.
- Baron, F. & B. M. Sandmaier: Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006, **20**, 1690-1700.
- Beatty, P. G., R. A. Clift, E. M. Mickelson, B. B. Nisperos, N. Flournoy, P. J. Martin, J. E. Sanders, P. Stewart, C. D. Buckner, R. Storb & et al.: Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *New England Journal of Medicine* 1985, **313**, 765-771.
- Bender, K., M. J. Farfan & P. M. Schneider: Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Science International* 2004, **139**, 135-140.
- Billingham, R. E.: The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lectures* 1966, **62**, 21-78.
- Bornhauser, M., U. Oelschlaegel, U. Platzbecker, G. Bug, K. Lutterbeck, M. G. Kiehl, J. Schetelig, A. Kiani, T. Illmer, M. Schaich, C. Theuser, B. Mohr, C. Brendel, A. A. Fauser, S. Klein, H. Martin, G. Ehninger & C. Thiede: Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2009, **94**, 1613-1617.
- Breathnach, S. M. & S. I. Katz: Immunopathology of cutaneous graft-versus-host disease. *American Journal of Dermatopathology* 1987, **9**, 343-348.
- Brookes, A. J.: The essence of SNPs. *Gene* 1999, **234**, 177-186.
- Cahn, J. Y., J. P. Klein, S. J. Lee, N. Milpied, D. Blaise, J. H. Antin, V. Leblond, N. Ifrah, J. P. Jouet, F. Loberiza, O. Ringden, A. J. Barrett, M. M. Horowitz & G. Socie: Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005, **106**, 1495-1500.
- Carella, A. M., S. Giralt & S. Slavin: Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as treatment of hematologic neoplasia. *Haematologica* 2000, **85**, 304-313.
- Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A.

- Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley & E. S. Lander: Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics* 1999, **22**, 231-238.
- Champlin, R., W. Ho, J. Gajewski, S. Feig, M. Burnison, G. Holley, P. Greenberg, K. Lee, I. Schmid, J. Giorgi & et al.: Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1990, **76**, 418-423.
- Childs, R., E. Clave, N. Contentin, D. Jayasekera, N. Hensel, S. Leitman, E. J. Read, C. Carter, E. Bahceci, N. S. Young & A. J. Barrett: Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999, **94**, 3234-3241.
- Chomczynski, P. & K. Mackey: Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Analytical Biochemistry* 1995, **225**, 163-164.
- Chomczynski, P. & N. Sacchi: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987, **162**, 156-159.
- Clausen, B. E. & J. M. Kel: Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunology and Cell Biology* 2010, **88**, 351-360.
- Clydesdale, G. J., G. W. Dandie & H. K. Muller: Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology* 2001, **79**, 547-568.
- Collin, M. P., D. N. Hart, G. H. Jackson, G. Cook, J. Cavet, S. Mackinnon, P. G. Middleton & A. M. Dickinson: The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Experimental Medicine* 2006, **203**, 27-33.
- Collins, F. S., L. D. Brooks & A. Chakravarti: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research* 1998, **8**, 1229-1231.
- Collins, R. H., Jr., Z. R. Rogers, M. Bennett, V. Kumar, A. Nikein & J. W. Fay: Hematologic relapse of chronic myelogenous leukemia following allogeneic bone marrow transplantation: apparent graft-versus-leukemia effect following abrupt discontinuation of immunosuppression. *Bone Marrow Transplantation* 1992, **10**, 391-395.
- Collins, R. H., Jr., O. Shpilberg, W. R. Drobyski, D. L. Porter, S. Giralt, R. Champlin, S. A. Goodman, S. N. Wolff, W. Hu, C. Verfaillie, A. List, W. Dalton, N. Ognoskie, A. Chetrit, J. H. Antin & J. Nemunaitis: Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of clinical Oncology* 1997, **15**, 433-444.
- Couriel, D., H. Caldera, R. Champlin & K. Komanduri: Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer* 2004, **101**, 1936-1946.
- Dazzi, F., R. M. Szydlo, N. C. Cross, C. Craddock, J. Kaeda, E. Kanfer, K. Cwynarski, E. Olavarria, A. Yong, J. F. Apperley & J. M. Goldman: Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients

- who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000, **96**, 2712-2716.
- de Bueger, M., A. Bakker, J. J. Van Rood, F. Van der Woude & E. Goulmy: Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *Journal of Immunology* 1992, **149**, 1788-1794.
- den Haan, J. M., L. M. Meadows, W. Wang, J. Pool, E. Blokland, T. L. Bishop, C. Reinhardus, J. Shabanowitz, R. Offringa, D. F. Hunt, V. H. Engelhard & E. Goulmy: The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science* 1998, **279**, 1054-1057.
- Dickinson, A. M. & E. Holler: Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. *Best Practice and Research. Clinical Haematology* 2008, **21**, 149-164.
- Durnam, D. M., K. R. Anders, L. Fisher, J. O'Quigley, E. M. Bryant & E. D. Thomas: Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood* 1989, **74**, 2220-2226.
- Eisenberg, E. & E. Y. Levanon: Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics* 2003, **19**, 362-365.
- Falkenburg, J. H., L. van de Corput, E. W. Marijt & R. Willemze: Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 2003, **31**, 743-751.
- Ferrara, J. L. & H. J. Deeg: Graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine* 1991, **324**, 667-674.
- Ferrara, J. L., J. E. Levine, P. Reddy & E. Holler: Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009, **373**, 1550-1561.
- Ferrara, J. L., R. Levy & N. J. Chao: Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1999, **5**, 347-356.
- Fithian, E., P. Kung, G. Goldstein, M. Rubinfeld, C. Fenoglio & R. Edelson: Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A* 1981, **78**, 2541-2544.
- Ford, C. E., J. L. Hamerton, D. W. Barnes & J. F. Loutit: Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956, **177**, 452-454.
- Fredriksson, M., G. Barbany, U. Liljedahl, M. Hermanson, M. Kataja & A. C. Syvanen: Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles. *Leukemia* 2004, **18**, 255-266.
- Gill, P.: An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int J Legal Med* 2001, **114**, 204-210.
- Giralt, S., E. Estey, M. Albitar, K. van Besien, G. Rondon, P. Anderlini, S. O'Brien, I. Khouri, J. Gajewski, R. Mehra, D. Claxton, B. Andersson, M. Beran, D. Przepiora, C. Koller, S. Kornblau, M. Korbling, M. Keating, H. Kantarjian & R. Champlin: Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997, **89**, 4531-4536.

- Giralt, S., J. Hester, Y. Huh, C. Hirsch-Ginsberg, G. Rondon, D. Seong, M. Lee, J. Gajewski, K. Van Besien, I. Khouri, R. Mehra, D. Przepiorka, M. Korblyng, M. Talpaz, H. Kantarjian, H. Fischer, A. Deisseroth & R. Champlin: CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995, **86**, 4337-4343.
- Glass, B., L. Uharek, W. Gassmann, B. Focks, H. Bolouri, H. Loeffler & W. Mueller-Ruchholtz: Graft-versus-leukemia activity after bone marrow transplantation does not require graft-versus-host disease. *Annals of Hematology* 1992, **64**, 255-259.
- Gluckman, E. & V. Rocha: Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. *Springer Seminars in Immunopathology* 2004, **26**, 143-154.
- Glucksberg, H., R. Storb, A. Fefer, C. D. Buckner, P. E. Neiman, R. A. Clift, K. G. Lerner & E. D. Thomas: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974, **18**, 295-304.
- Goulmy, E., R. Schipper, J. Pool, E. Blokland, J. H. Falkenburg, J. Vossen, A. Gratwohl, G. B. Vogelsang, H. C. van Houwelingen & J. J. van Rood: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *New England Journal of Medicine* 1996, **334**, 281-285.
- Grimm, J., W. Zeller & A. R. Zander: Soluble interleukin-2 receptor serum levels after allogeneic bone marrow transplantations as a marker for GVHD. *Bone Marrow Transplantation* 1998, **21**, 29-32.
- Haniffa, M., F. Ginhoux, X. N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilkens, M. Merad & M. Collin: Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of Experimental Medicine* 2009, **206**, 371-385.
- Hibi, S., K. Tsunamoto, S. Todo, T. Sawada, Y. Ueda, M. Taniwaki, M. Naya, M. Hojo & S. Imashuku: Chimerism analysis on mononuclear cells in the CSF after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1997, **20**, 503-506.
- Higashi, M. K., D. L. Veenstra, L. M. Kondo, A. K. Wittkowsky, S. L. Srinouanprachanh, F. M. Farin & A. E. Rettie: Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002, **287**, 1690-1698.
- Holler, E., B. Ertl, R. Hintermeier-Knabe, M. G. Roncarolo, G. Eissner, F. Mayer, P. Fraunberger, U. Behrends, W. Pfannes, H. J. Kolb & W. Wilmanns: Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation? *Leukemia & Lymphoma* 1997, **25**, 217-224.
- Holler, E., H. J. Kolb, G. Eissner & W. Wilmanns: Cytokines in GvH and GvL. *Bone Marrow Transplantation* 1998, **22 Suppl 4**, S3-6.
- Holler, E., H. J. Kolb, R. Hintermeier-Knabe, J. Mittermuller, S. Thierfelder, M. Kaul & W. Wilmanns: Role of tumor necrosis factor alpha in acute graft-

- versus-host disease and complications following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation Proceedings* 1993, **25**, 1234-1236.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck & et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990, **75**, 555-562.
- Hudecek, M., K. Bartsch, S. Tschiedel & D. Niederwieser: [Minor antigens - major impact. The role of minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2008, **133**, 1511-1516.
- Huss, R., H. J. Deeg, T. Gooley, E. Bryant, W. Leisenring, R. Clift, C. D. Buckner, P. Martin, R. Storb & F. R. Appelbaum: Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1996, **18**, 767-776.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson & S. L. Thein: Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985, **316**, 76-79.
- Kammerer, S., R. B. Roth, C. R. Hoyal, R. Reneland, G. Marnellos, M. Kiechle, U. Schwarz-Boeger, L. R. Griffiths, F. Ebner, J. Rehbock, C. R. Cantor, M. R. Nelson & A. Braun: Association of the NuMA region on chromosome 11q13 with breast cancer susceptibility. *Proceeding National Academy of Science of the U S A* 2005, **102**, 2004-2009.
- Kampgen, E., N. Koch, F. Koch, P. Stoger, C. Heufler, G. Schuler & N. Romani: Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 1991, **88**, 3014-3018.
- Kämpgen, E. a. B., J.: Zelltherapie mi dendritischen Zellen. *Der Internist* 2001, **42**, 1314-1320.
- Kan, Y. W. & A. M. Dozy: Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proceeding National Academy of Science of the U S A* 1978, **75**, 5631-5635.
- Karrer, S.: [Cutaneous graft-versus-host disease]. *Hautarzt* 2003, **54**, 465-480; quiz 481-2.
- Kim, S. & A. Misra: SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2007, **9**, 289-320.
- Knowlton, R. G., V. A. Brown, J. C. Braman, D. Barker, J. W. Schumm, C. Murray, T. Takvorian, J. Ritz & H. Donis-Keller: Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 1986, **68**, 378-385.
- Kolb, H. J.: Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008, **112**, 4371-4383.
- Kolb, H. J., W. Gunther, M. Schumm, E. Holler, W. Wilmanns & S. Thierfelder: Adoptive immunotherapy in canine chimeras. *Transplantation* 1997, **63**, 430-436.
- Kolb, H. J., J. Mittermuller, C. Clemm, E. Holler, G. Ledderose, G. Brehm, M. Heim & W. Wilmanns: Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent

- chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990, **76**, 2462-2465.
- Kolb, H. J., A. Schattenberg, J. M. Goldman, B. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, P. Ljungman, A. Ferrant, L. Verdonck, D. Niederwieser, F. van Rhee, J. Mittermueller, T. de Witte, E. Holler & H. Ansari: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995, **86**, 2041-2050.
- Kolb, H. J., C. Schmid, A. J. Barrett & D. J. Schendel: Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004, **103**, 767-776.
- Korngold, R. & J. Sprent: T cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* 1987, **44**, 335-339.
- Kottaridis, P. D., D. W. Milligan, R. Chopra, R. K. Chakraverty, S. Chakrabarti, S. Robinson, K. Peggs, S. Verfueth, R. Pettengell, J. C. Marsh, S. Schey, P. Mahendra, G. J. Morgan, G. Hale, H. Waldmann, M. C. de Elvira, C. D. Williams, S. Devereux, D. C. Linch, A. H. Goldstone & S. Mackinnon: In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000, **96**, 2419-2425.
- Kruglyak, L. & D. A. Nickerson: Variation is the spice of life. *Nature Genetics* 2001, **27**, 234-236.
- Kuwano, R., A. Miyashita, H. Arai, T. Asada, M. Imagawa, M. Shoji, S. Higuchi, K. Urakami, A. Kakita, H. Takahashi, T. Tsukie, S. Toyabe, K. Akazawa, I. Kanazawa & Y. Ihara: Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 2006, **15**, 2170-2182.
- Lai, Y. & R. L. Gallo: Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infectious Disorders Drug Targets* 2008, **8**, 144-155.
- Landegren, U., M. Nilsson & P. Y. Kwok: Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research* 1998, **8**, 769-776.
- Lane, T. A., P. Law, M. Maruyama, D. Young, J. Burgess, M. Mullen, M. Mealiffe, L. W. Terstappen, A. Hardwick, M. Moubayed & et al.: Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1995, **85**, 275-282.
- Lawler, M., P. Humphries & S. R. McCann: Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991, **77**, 2504-2514.
- Liljedahl, U., L. Lind, L. Kurland, L. Berglund, T. Kahan & A. C. Syvanen: Single nucleotide polymorphisms in the apolipoprotein B and low density lipoprotein receptor genes affect response to antihypertensive treatment. *BMC Cardiovascular Disorders* 2004, **4**, 16.
- Lim, Z. Y., L. Pearce, A. Y. Ho, L. Barber, W. Ingram, M. Usai, K. Tobal, S. Devereux, A. Pagliuca & G. J. Muftic: Delayed attainment of full donor chimerism following alemtuzumab-based reduced-intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia and

- myelodysplastic syndromes is associated with improved outcomes. *British Journal of Haematology* 2007, **138**, 517-526.
- Lion, T.: Detection of impending graft rejection and relapse by lineage-specific chimerism analysis. *Methods in Molecular Medicine* 2007, **134**, 197-216.
- MacKinnon, S.: Who may benefit from donor leucocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation? *British Journal of Haematology* 2000, **110**, 12-17.
- Mackinnon, S., L. Barnett, G. Heller & R. J. O'Reilly: Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994, **83**, 3409-3416.
- Mackinnon, S., E. B. Papadopoulos, M. H. Carabasi, L. Reich, N. H. Collins, F. Boulad, H. Castro-Malaspina, B. H. Childs, A. P. Gillio, N. A. Kernan & et al.: Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995, **86**, 1261-1268.
- Mapara, M. Y., Y. M. Kim, S. P. Wang, R. Bronson, D. H. Sachs & M. Sykes: Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood* 2002, **100**, 1903-1909.
- Mapara, M. Y. & M. Sykes: Induction of mixed vs full chimerism to potentiate GVL effects after bone-marrow transplantation. *Methods in Molecular Medicine* 2005, **109**, 469-474.
- Maraninchi, D., E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J. L. Pico, V. Leblond, M. Michallet, F. Dreyfus, N. Ifrah & et al.: Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 1987, **2**, 175-178.
- Martin, E. R., E. H. Lai, J. R. Gilbert, A. R. Rogala, A. J. Afshari, J. Riley, K. L. Finch, J. F. Stevens, K. J. Livak, B. D. Slotterbeck, S. H. Slifer, L. L. Warren, P. M. Conneally, D. E. Schmechel, I. Purvis, M. A. Pericak-Vance, A. D. Roses & J. M. Vance: SNPing away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics* 2000, **67**, 383-394.
- Martin, P. J., J. A. Hansen, C. D. Buckner, J. E. Sanders, H. J. Deeg, P. Stewart, F. R. Appelbaum, R. Clift, A. Fefer, R. P. Witherspoon & et al.: Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* 1985, **66**, 664-672.
- Massenkeil, G.: Stellenwert der nichtmyeloablativen Stammzelltransplantation und adoptiven Immuntherapie bei akuten Leukämien und refraktären Nierenzellkarzinomen: Entwicklung eines immunologischen Therapiekonzeptes [Habilitationsschrift]. Berlin: Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2004
- Mathe, G., J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, A. Cattan, M. Schneider, M. J. Devries, M. Tubiana, C. Lalanne, J. L. Binet, M. Papiernik, G. Seman, M. Matsukura, A. M. Mery, V. Schwarzmann & A. Flaisler: Successful Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Man: Chimerism, Induced Specific Tolerance and Possible Anti-Leukemic Effects. *Blood* 1965, **25**, 179-196.

- Matte, C. C., J. Liu, J. Cormier, B. E. Anderson, I. Athanasiadis, D. Jain, J. McNiff & W. D. Shlomchik: Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nature Medicine* 2004, **10**, 987-992.
- Mattsson, J., M. Uzunel, M. Remberger & O. Ringden: T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001, **71**, 433-439.
- Matzinger, P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* 1994, **12**, 991-1045.
- Maxam, A. M. & W. Gilbert: A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 1977, **74**, 560-564.
- McCarthy, J. J. & R. Hilfiker: The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nature Biotechnology* 2000, **18**, 505-508.
- McSweeney, P. A., D. Niederwieser, J. A. Shizuru, B. M. Sandmaier, A. J. Molina, D. G. Maloney, T. R. Chauncey, T. A. Gooley, U. Hegenbart, R. A. Nash, J. Radich, J. L. Wagner, S. Minor, F. R. Appelbaum, W. I. Bensinger, E. Bryant, M. E. Flowers, G. E. Georges, F. C. Grumet, H. P. Kiem, B. Torok-Storb, C. Yu, K. G. Blume & R. F. Storb: Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001, **97**, 3390-3400.
- McSweeney, P. A. & R. Storb: Mixed chimerism: preclinical studies and clinical applications. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1999, **5**, 192-203.
- Merad, M., P. Hoffmann, E. Ranheim, S. Slaymaker, M. G. Manz, S. A. Lira, I. Charo, D. N. Cook, I. L. Weissman, S. Strober & E. G. Engleman: Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nature Medicine* 2004, **10**, 510-517.
- Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster & E. G. Engleman: Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology* 2002, **3**, 1135-1141.
- Meyer, R. G., C. M. Britten, D. Wehler, K. Bender, G. Hess, A. Konur, U. F. Hartwig, T. C. Wehler, A. J. Ullmann, C. Gentilini, L. Uharek, C. Huber, K. Kolbe & W. Herr: Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. *Blood* 2007, **109**, 374-382.
- Meyer, R. G., E. M. Wagner, A. Konur, K. Bender, T. Schmitt, J. Hemmerling, D. Wehler, U. F. Hartwig, E. Roosnek, C. Huber, K. Kolbe & W. Herr: Donor CD4 T cells convert mixed to full donor T-cell chimerism and replenish the CD52-positive T-cell pool after alemtuzumab-based T-cell-depleted allo-transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2010, **45**, 668-674.
- Mohty, M. & B. Gaugler: Inflammatory cytokines and dendritic cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008, **19**, 53-63.
- Montero, A., B. N. Savani, R. Kurlander, E. J. Read, S. F. Leitman, R. Childs, S. R. Solomon & A. J. Barrett: Lineage-specific engraftment and outcomes after T-

- cell-depleted peripheral blood stem cell transplant with Flu/Cy/TBI conditioning. *British Journal of Haematology* 2005, **130**, 733-739.
- Mora, J. R., G. Cheng, D. Picarella, M. Briskin, N. Buchanan & U. H. von Andrian: Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine* 2005, **201**, 303-316.
- Mülhardt, C.: RNA. In: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003a, pp. 111-112.
- Mülhardt, C.: RNA. In: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003b, pp. 108-111.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1986, **51 Pt 1**, 263-273.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987, **155**, 335-350.
- Najfeld, V., W. Burnett, A. Vlachos, E. Scigliano, L. Isola & S. Fruchtman: Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. *Bone Marrow Transplantation* 1997, **19**, 829-834.
- Niethammer, D., S. F. Goldmann, H. D. Flad, P. Wernet, G. Stursberg, J. Colombani, T. M. Fliedner & E. Kleihauer: Split chimerism in three patients suffering from severe combined immunodeficiency (SCID). *Haematology and Blood Transfusion* 1980, **25**, 391-401.
- Nimer, S. D., J. Giorgi, J. L. Gajewski, N. Ku, G. J. Schiller, K. Lee, M. Territo, W. Ho, S. Feig, M. Selch & et al.: Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation* 1994, **57**, 82-87.
- Pastinen, T., A. Kurg, A. Metspalu, L. Peltonen & A. C. Syvanen: Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research* 1997, **7**, 606-614.
- Peggs, K. S., K. Thomson, D. P. Hart, J. Geary, E. C. Morris, K. Yong, A. H. Goldstone, D. C. Linch & S. Mackinnon: Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses. *Blood* 2004, **103**, 1548-1556.
- Pirmohamed, M., K. Lin, D. Chadwick & B. K. Park: TNFalpha promoter region gene polymorphisms in carbamazepine-hypersensitive patients. *Neurology* 2001, **56**, 890-896.
- Prentice, H. G., H. A. Blacklock, G. Janossy, M. J. Gilmore, L. Price-Jones, N. Tidman, L. K. Trejdosiewicz, D. B. Skeggs, D. Panjwani, S. Ball & et al.: Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet* 1984, **1**, 472-476.
- Przepiora, D., T. L. Smith, J. Folloder, I. Khouri, N. T. Ueno, R. Mehra, M. Korbling, Y. O. Huh, S. Giralt, J. Gajewski, M. Donato, K. Cleary, D. Claxton, I. Braunschweig, K. van Besien, B. S. Andersson, P. Anderlini & R. Champlin: Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 1999, **94**, 1465-1470.

- Ramirez, M., M. A. Diaz, F. Garcia-Sanchez, M. Velasco, F. Casado, M. Villa, J. L. Vicario & L. Madero: Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1996, **18**, 1161-1165.
- Rocha, D., I. Gut, A. J. Jeffreys, P. Y. Kwok, A. J. Brookes & S. J. Chanock: Seventh international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis: 'ever bigger scans and an increasingly variable genome'. *Human Genetics* 2006, **119**, 451-456.
- Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch & P. Stoitzner: Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 2003, **111**, 725-740.
- Roux, E., K. Abdi, D. Speiser, C. Helg, B. Chapuis, M. Jeannet & E. Roosnek: Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukemia transplanted with T-cell-depleted bone marrow: involvement of different hematologic lineages before and after relapse. *Blood* 1993, **81**, 243-248.
- Rowlings, P. A., D. Przepiorka, J. P. Klein, R. P. Gale, J. R. Passweg, P. J. Henslee-Downey, J. Y. Cahn, S. Calderwood, A. Gratwohl, G. Socie, M. M. Abecasis, K. A. Sobocinski, M. J. Zhang & M. M. Horowitz: IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *British Journal of Haematology* 1997, **97**, 855-864.
- Sanchez, J. J., C. Borsting, C. Hallenberg, A. Buchard, A. Hernandez & N. Morling: Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 2003, **137**, 74-84.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 1977, **74**, 5463-5467.
- Schneider, P., L. Wolters, G. Schoone, H. Schallig, P. Sillekens, R. Hermsen & R. Sauerwein: Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of Plasmodium falciparum. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, **43**, 402-405.
- Schuler, G. & R. M. Steinman: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine* 1985, **161**, 526-546.
- Seong, C. M., S. Giralt, H. Kantarjian, J. Xu, J. Swantkowski, K. Hayes, A. B. Glassman, I. Khouri, M. Korbling, P. Thall, M. J. Siciliano & R. E. Champlin: Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2000, **18**, 1831-1836.
- Shlomchik, W. D., M. S. Couzens, C. B. Tang, J. McNiff, M. E. Robert, J. Liu, M. J. Shlomchik & S. G. Emerson: Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999, **285**, 412-415.
- Silberberg, I.: Apposition of mononuclear cells to langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Dermato Venereologica* 1973, **53**, 1-12.
- Simpson, E., D. Scott, E. James, G. Lombardi, K. Cwynarski, F. Dazzi, J. M. Millrain & P. J. Dyson: Minor H antigens: genes and peptides. *European Journal of Immunogenetics* 2001, **28**, 505-513.

- Slavin, S., A. Ackerstein, E. Naparstek, R. Or & L. Weiss: The graft-versus-leukemia (GVL) phenomenon: is GVL separable from GVHD? *Bone Marrow Transplantation* 1990, **6**, 155-161.
- Slavin, S., A. Nagler, E. Naparstek, Y. Kapelushnik, M. Aker, G. Cividalli, G. Varadi, M. Kirschbaum, A. Ackerstein, S. Samuel, A. Amar, C. Brautbar, O. Ben-Tal, A. Eldor & R. Or: Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998, **91**, 756-763.
- Soiffer, R. J., R. Gonin, C. Murray, M. J. Robertson, K. Cochran, S. Chartier, C. Cameron, J. Daley, H. Levine, L. M. Nadler & et al.: Prediction of graft-versus-host disease by phenotypic analysis of early immune reconstitution after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1993, **82**, 2216-2223.
- Sorrer, M. L., M. B. Maris, B. Storer, B. M. Sandmaier, R. Diaconescu, C. Flowers, D. G. Maloney & R. Storb: Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 2004, **104**, 961-968.
- Steinman, R. M. & Z. A. Cohn: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine* 1973, **137**, 1142-1162.
- Sullivan, K. M., P. L. Weiden, R. Storb, R. P. Witherspoon, A. Fefer, L. Fisher, C. D. Buckner, C. Anasetti, F. R. Appelbaum, C. Badger & et al.: Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 1989, **73**, 1720-1728.
- Sykes, M., F. Preffer, S. McAfee, S. L. Saidman, D. Weymouth, D. M. Andrews, C. Colby, R. Sackstein, D. H. Sachs & T. R. Spitzer: Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *Lancet* 1999, **353**, 1755-1759.
- Sykes, M., M. A. Sheard & D. H. Sachs: Graft-versus-host-related immunosuppression is induced in mixed chimeras by alloresponses against either host or donor lymphohematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine* 1988, **168**, 2391-2396.
- Tabbara, I. A., S. Kairouz, Z. Nahleh & A. M. Mihalcea: Current concepts in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Anticancer Research* 2003, **23**, 5055-5067.
- Tautz, D.: Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS* 1993, **67**, 21-28.
- Teshima, T., R. Ordemann, P. Reddy, S. Gagin, C. Liu, K. R. Cooke & J. L. Ferrara: Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nature Medicine* 2002, **8**, 575-581.
- Thiede, C., M. Bornhauser & G. Ehninger: Evaluation of STR informativity for chimerism testing--comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia* 2004, **18**, 248-254.

- Thiede, C., M. Bornhauser, U. Oelschlagel, C. Brendel, R. Leo, H. Daxberger, B. Mohr, M. Florek, F. Kroschinsky, G. Geissler, R. Naumann, M. Ritter, G. Prange-Krex, T. Lion, A. Neubauer & G. Ehninger: Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001, **15**, 293-302.
- Thomas, E., R. Storb, R. A. Clift, A. Fefer, F. L. Johnson, P. E. Neiman, K. G. Lerner, H. Glucksberg & C. D. Buckner: Bone-marrow transplantation (first of two parts). *New England Journal of Medicine* 1975a, **292**, 832-843.
- Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., W. C. Lu & J. W. Ferrebee: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New England Journal of Medicine* 1957, **257**, 491-496.
- Thomas, E. D., R. Storb, R. A. Clift, A. Fefer, L. Johnson, P. E. Neiman, K. G. Lerner, H. Glucksberg & C. D. Buckner: Bone-marrow transplantation (second of two parts). *New England Journal of Medicine* 1975b, **292**, 895-902.
- Turner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen & G. Schuler: Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *Journal of Experimental Medicine* 1999, **190**, 1669-1678.
- Tse, W. & M. J. Laughlin: Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology American Society of Hematology Education Program* 2005, 377-383.
- Underhill, P. A., P. Shen, A. A. Lin, L. Jin, G. Passarino, W. H. Yang, E. Kauffman, B. Bonne-Tamir, J. Bertranpetit, P. Francalacci, M. Ibrahim, T. Jenkins, J. R. Kidd, S. Q. Mehdi, M. T. Seielstad, R. S. Wells, A. Piazza, R. W. Davis, M. W. Feldman, L. L. Cavalli-Sforza & P. J. Oefner: Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nature Genetics* 2000, **26**, 358-361.
- Valks, R., J. Fernandez-Herrera, B. Bartolome, J. Fraga, E. Dauden & A. Garcia-Diez: Late appearance of acute graft-vs-host disease after suspending or tapering immunosuppressive drugs. *Archives of Dermatology* 2001, **137**, 61-65.
- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque & S. Saeland: Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000, **12**, 71-81.
- Van Bergen, C. A., C. E. Rutten, E. D. Van Der Meijden, S. A. Van Luxemburg-Heijs, E. G. Lurvink, J. J. Houwing-Duistermaat, M. G. Kester, A. Mulder, R. Willemze, J. H. Falkenburg & M. Griffioen: High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning. *Cancer Research*, **70**, 9073-9083.

- Vela-Ojeda, J., M. A. Garcia-Ruiz Esparza, E. Reyes-Maldonado, L. Jimenez-Zamudio, M. Moreno-Lafont, E. Garcia-Latorre, E. Ramirez-Sanjuan, L. Montiel-Cervantes, F. Tripp-Villanueva, L. D. Garcia-Leon, M. Ayala-Sanchez, A. Rosas-Cabral, J. A. Avina-Zubieta, G. Galindo-Rodriguez, M. Vadillo-Buenfil & D. Salazar-Exaire: Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation: prognostic significance of the dose of CD3(+) and CD4(+) lymphocytes. *Annals of Hematology* 2004, **83**, 295-301.
- Weiden, P. L., N. Flournoy, E. D. Thomas, R. Prentice, A. Fefer, C. D. Buckner & R. Storb: Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *New England Journal of Medicine* 1979, **300**, 1068-1073.
- Weiden, P. L., K. M. Sullivan, N. Flournoy, R. Storb & E. D. Thomas: Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *New England Journal of Medicine* 1981, **304**, 1529-1533.
- Weisdorf, D., R. Hakke, B. Blazar, W. Miller, P. McGlave, N. Ramsay, J. Kersey & A. Filipovich: Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 1991, **51**, 1197-1203.
- Williams, C., R. Williamson, C. Coutelle, F. Loeffler, J. Smith & A. Ivinson: Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification. *Lancet* 1988, **2**, 102-103.
- Zhang, Y., J. P. Louboutin, J. Zhu, A. J. Rivera & S. G. Emerson: Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation* 2002, **109**, 1335-1344.

Bild-Quellen

Dendritische Zelle

Stand 19.06.2011

<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/314117>

Durchflusszytometrie

Stand 19.06.2011

<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>

GvHD - Arm

Stand 19.6.2011

<http://emedicine.medscape.com/article/429037-overview#a0104>

GvHD - Hände

Stand 19.6.2011

<http://emedicine.medscape.com/article/429037-clinical#a0217>

Langerhans Zelle - Elektronenmikroskop

Stand 15.3.2010

www.infekt.ch/switch/printarticle.php?artID=1644

SymAtlas - SART1

Stand 29.03.2010

<http://biogps.gnf.org/?symatlas=/SymAtlas/symform%3f#goto=genereport&id=9092>

Internet-Seiten/Programme

Oligonucleotide Properties Calculator

Stand 19.06.2011

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

Primer 3

Stand 19.06.2011

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)

Pubmed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

SymAtlas

Stand 19.06.2011

(<http://biogps.gnf.org/?symatlas=/SymAtlas/symform%3f#goto=welcome>)

9 Anhang

Tabelle der Gene und deren SNPs sowie Daten der Primer

Gen	rs-Nr.	SNP	Definition/Gen-Information	Primer F	Primer R	HF	Exon	Intron	Gesamt länge
AP1B1	174765	G/A	adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	CTCCAACAGCAGCAGTACCA	ACTGGGCTCATTCTCATTG	40/60	536	(4)7915	8451
AP1B1	2072051	G/A	Adapter Proteinkomplex am Golgi-Apparat	GGCAGAGCTCAACAGTGACA	TGCTTTCGCACATATGGAT	64/36	364	(2)3891	4255
BSG	8637	G/A	Basigin Mitglied der Superfamilie der Immunoglobuline, spielt eine Rolle bei interzellulären immunologischen Reaktionen	GCCGGTCAGAGCTACACATT	AATCTACGGGGTGGGTTTTTC	60/40	432	(3)1064	1496
BTBD2	1610045	C/T	BTB (POZ) domain containing 2 Topoisomerase-Bindeprotein	CTTTGATGCCATGTTCAACG	CTTCAGGAAGTCCACGCAAT	57/43	210	(1)4166	4376
CKB	1803283	G/A	creatine kinase, brain Kreatinkinase (hpts. im Gehirn)	CATATCAAGCTGCCAACCT	CACTGCCAGGCAATAAGTT	68/32	327	(1)78	405
CKB	12505	C/T		CATATCAAGCTGCCAACCT	CACTGCCAGGCAATAAGTT	59/41	327	(1)78	405
DAD1	7621	A/C	defender against cell death 1 inhibiert Zelltod mittels Apoptose, bei Überexpression mögliche Assoziation zu Malignomen	TGTGTGGGGAGTTTCATCCT	GAAAGGCAGAGGCTGGATTA	60/40	382	(2) 23640	24022
DDOST	4704	C/T	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase Transferase des rauen Endoplasmatischen Retikulums	CTCACATTCAAGACCGTGA	TCCAGCACAAAGGGTTATC	38/62	419	(4)5883	6302
GOT2	257636	C/T	glutamic-oxaloacetic transaminase 2 Glutamat-Oxalacetat Transaminase 2	GGACCTCCAGATCCCATTCT	CGGCCACTCTTCAAGACTTC	36/64	262	(2)4359-G	4621
GOT2	30842	G/T		TGCCAATCATATGCCAAGAA	GTTCAGGCTTTAGCCCTGTG	65/35	351	(2)6927	7278
ID3	1050096	C/T	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein inhibiert Transkription best. DNA-Abschnitte	AAAGGAGCTTTTGCCACTGA	CCAAGGAGACCAGAAGACCA	38/62	374	(1)518	892
LASP1	525982	G/A	LIM and SH3 protein 1 Actin-Bindeprotein, mögliche Assoziationen zu Malignomen	GAAGACCCAGGACCAGATCA	CAGATGGCCTCCACGTAGTT	70/30	453	(3)19827	20280
LDLR	5925	C/T	Low density lipoprotein Rezeptor	AAGCCATTTTCAGTGCCAAC	TGGTGTGTGCTGTGCCTT	37/63	351	(2) 2728	3079

Gen	rs-Nr.	SNP	Definition/Gen-Information	Primer F	Primer R	HF	Exon	Intron	Gesamt länge
MCM3AP	11702450	C/T	minichromosome maintenance complex component 3 associated protein (MCM3AP) Essentiell zur Initiation der DNA-Replikation	CCTCCAGACAAAACGACCTGT	ACCACTGCAAGCTTTTTGCT	40/60	469	(2)3266	3735
MCM3AP	2839181	C/T		TGAGCACACAGCGATCTACC	CGGCTCTACACCACACTCCT	59/41	397	(2)1214	1611
MCM3AP	2839173	C/T		CTCCAGGAGCTTCAGTGCTT	AGCACCAGCTTCCAAAACAC	37/63	396	(3)4142	4538
MRPL9	8480	A/C	mitochondrial ribosomal protein L9 Mitochondriales Ribosomales Protein L9	GCATCCCCTGAAAACAAGAA	GAGCTGGGAGTGAGATCAGG	57/43	495	(4)1953	2448
NFKBIA	696	G/A	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha inhibiert NFkB, welches über DNA-Bindung Expressionen bestimmter Gene kontrolliert	CCAGGGCTATTCTCCCTACC	ACCACTGGGGTCAGTCACTC	35/65	545	(1)332	877
NFKBIA	8904	C/T		CCAGGGCTATTCTCCCTACC	ACCACTGGGGTCAGTCACTC	67/33	545	(1)332	877
PGD	2229687	C/T	phosphogluconate dehydrogenase 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase	TGAGGCATACCACCTGATGA	TGATAAGCACCGAGCAAAGA	69/31	267	(2)5242	5509
POLR2L	6591	G/A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L Untereinheit der RNA-Polymerase 2	GCAACAAGTGGGAGGCTTAC	TCCTTCCAGAGTGGGGTATG	55/45	301	(1)1932	2233
PTOV1	10996	G/T	prostate tumor overexpressed gene 1 Rolle in Zellproliferation, Überexpression in Prostata-Ca	GAAGCGCAGACCCTACTCTG	CCACTCCATGCCAGAACTT	45/55	477	(5)2679	3156
PTTG1IP	235314	G/A	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein stimuliert PTTG1, welches die Transkription von Wachstumsfaktoren für Fibroblasten erhöht. Mögliche Assoziation zu mehreren Malignomen	CATCACCATGTCGGTAGTCG	GTCACCAGTCTGCAAGACGA	50/50	431	(2)4516	4947
RPN1	1697	G/A	Protein des rauen Endoplasmatischen Retikulums	CGTGCAGGTAAAGGGAGAAG	CCCAGCTTGGTGTAGCTCTC	67/33	312	(2)12367	12679
SART1	550435	G/A	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells involviert in der Regulation von Zellproliferation, Epitope werden von Zytotoxischen T-Zellen registriert, mögliche Assoziation zur Atopie	CTAACAAACTCCGGGCAAAG	CTCTGGTCCATCTCCTCCA	60/40	323	(4) 1281	1604
SART1	660118	C/G		CTGGCCTCCGAATACCTCAC	CAATCTCCACCACCTTCTCG	50/50	430	(3) 881	1311
SRP14	8208	C/T	signal recognition particle 14kDa Signal-Erkennungs-Partikel, RNA Bindeprotein	CGGAGCTGACCAGACTTTTC	TGGTCAATTGGTGAAAGCAG	69/31	414	(3) 2330	2744
TACC1	2013586	G/A	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	AAGGAAGCTTGGCAGGAAAC	TCTAATAGGGATGGCCATGC	45/55	497	(2)6469	6966

Gen	rs-Nr.	SNP	Definition/Gen-Information	Primer F	Primer R	HF	Exon	Intron	Gesamt länge
			Zentrosomales Protein, assoziiert mit mehreren Malignomen, insbesondere Brust-Ca						
TCEB2	1058855	C/G	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 Transkriptions-Elongationsfaktor B, Polypeptid 2	GTGGCTTCACCAGTCAAACA	CTCTCCCAGTCCTCCCTTT	33/67	482	(1) 3348	3830
TFRC	3817672	G/A	transferrin receptor (p90, CD71) Transferrin-Rezeptor (p90, CD71), Regulation im Eisenhaushalt	GTGAGAGACTGGCAGGAACC	ACGCCAGACTTTGCTGAGTT	58/42	257	(1)1776	2033

Tab. 9.1 Alle erfolgreich getesteten Primer, mit Angaben bezüglich des Gens, der rs-Nummer, Informationen über die Funktion des Gens, dem SNP, dem Forward, als auch dem Reversen Primer, der Heterozygotenfrequenz in % (HF), der Produktlänge (Exon), der Anzahl () und der Länge der Introns, welche sich in der Originalsequenz-Sequenz befinden und die sich daraus ergebende Gesamtlänge bei genomischer Kontamination.

